



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CÁSSIA RODRIGUES ROQUE

**NEUROPROTEÇÃO FORNECIDA POR DOCOSANOIDES: UMA NOVA
ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA NO AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL**

FORTALEZA

2023

CÁSSIA RODRIGUES ROQUE

NEUROPROTEÇÃO FORNECIDA POR DOCOSANOIDES: UMA NOVA ESTRATÉGIA
TERAPÊUTICA NO AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- R69n Roque, Cássia Rodrigues.
Neuroproteção fornecida por docosanoides: uma nova estratégia terapêutica no AVC isquêmico experimental / Cássia Rodrigues Roque. – 2023.
126 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.
1. Docosanoides. 2. MCAo. 3. LAU-0901. 4. AT-NPD1. 5. Neuroproteção. I. Título.
CDD 615.1
-

CÁSSIA RODRIGUES ROQUE

NEUROPROTEÇÃO FORNECIDA POR DOCOSANOIDES: UMA NOVA ESTRATÉGIA
TERAPÊUTICA NO AVC ISQUÊMICO EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Farmacologia. Área de concentração: Neurociências.

Aprovada em: 19/07/2023.

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. Marcio Wilker Soares Campelo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Carlos Campos Câmara
Universidade Federal do Semiárido (UFERSA)

Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

A Deus.

A minha mãe e a minha avó, Maria José e
Idelzuite (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e discernimento para seguir os caminhos conforme Seus planos.

À minha mãe, minha avó materna e minha prima Mikaele (todas *in memoriam*): três perdas devastadoras durante o meu período de doutorado, mas a lembrança das mesmas foi o meu combustível para não desistir.

Aos demais membros da minha família e agregados por terem sonhado esse doutorado junto comigo.

Ao meu noivo, Phillippo, por seu amor e olhar diferenciado sobre mim.

Aos meus amigos, em especial, Ana Karoline Lima, Luan Costa, Márcia Alves e Lúcia Simões pelos conselhos, advertências e convívio em todas as circunstâncias.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá pelo apoio, compreensão e confiança; aprendi a acreditar mais no potencial e amadureci profissional com os seus ensinamentos.

À Dr. Ludmila Belayev e ao Dr. Nicolas Bazan que viabilizaram minha ida aos EUA para realizar um período de intercâmbio na Louisiana State University. E à técnica Larissa Khoutorova e à aluna de doutorado Madigan Reid pelo acolhimento e aprendizados durante o doutorado-sanduíche.

Aos colegas de LABICONTE por todo companheirismo e trocas de experiências.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio do doutorado no Brasil e do intercâmbio nos Estados Unidos, respectivamente.

Aos professores participantes da banca examinadora pela disponibilidade em colaborar com sugestões para melhora do trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, docentes e funcionários por toda ajuda. E aos colegas discentes pelos momentos compartilhados.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

(*Guimarães Rosa; Grande Sertão: Veredas, 1956*)

RESUMO

O Acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico agudo desencadeia alterações neurovasculares, neuroinflamatórias e sinápticas complexas. A neuroproteção para atenuar ou bloquear a cascata isquêmica e salvar o dano neuronal tem sido extensivamente explorada no tratamento do AVC isquêmico. No entanto, apesar do crescente conhecimento das caracterizações fisiológicas, mecanísticas e de imagem da penumbra isquêmica, nenhuma terapia neuroprotetora eficaz foi encontrada. Testamos a hipótese se a administração do antagonista do fator ativador de plaquetas (PAF) LAU-0901 e alguns docosanoides selecionados (DHA, NPD1, AT-NPD1 e RvD1) em monoterapia ou em associação, após a oclusão da artéria carótida média (MCAo), levaria à recuperação neurológica. Ratos Sprague-Dawley machos foram submetidos à MCAo e após o período estabelecido pela série experimental executada (entre 2 e 6 h) foi realizada a administração das substâncias. Testes de comportamento, ressonância magnética *ex vivo* e análise lipidômica foram conduzidos para avaliar as características da lesão. A série 1 foi dividida em três protocolos: (LAU-0901+NPD1, 14d), (LAU-0901+AT-NPD1, 3d) e (LAU-0901+DHA, 1d). Nas séries 2 e 3 foram realizados os estudos de dose-resposta e janela terapêutica, respectivamente, do LAU, NPD1 e AT-NPD1, e RvD1 e NPD1, sozinhos ou combinados e em diferentes dosagens. Na série 1 foi observado que os grupos combinados melhoraram o comportamento em comparação com os tratamentos NPD1, AT-NPD1 ou DHA sozinhos. Os volumes totais de lesão foram reduzidos com LAU-0901+NPD1 em 62% e LAU-0901+AT-NPD1 em 90% dos tratamentos versus grupos de veículos. LAU-0901 e LAU-0901 + DHA aumentaram a produção de mediadores lipídicos vasoativos (prostaglandinas: PGE₂, PGF_{2-α}, 6-ceto-PGF_{1-α} e PGD₂), bem como um mediador regulador inflamatório ácido hidroxioctadecadienóico. Em contraste, LAU-0901 e LAU-0901 + DHA diminuíram a produção de ácido 12-hidroxi-eicosatetraenóico, um mediador pró-inflamatório. Na série 2, os tratamentos com LAU e AT-NPD1 sozinhos melhoraram o comportamento em 40–42% e 20–30%, respectivamente, e LAU+AT-NPD1 em 40% em comparação com o grupo veículo. Os volumes de imagem ponderada em T2 (T2WI) foram reduzidos com todas as doses de LAU e AT-NPD1 em 73–90% e 67–83% e LAU+AT-NPD1 em 94% em comparação com o veículo. Na janela terapêutica, LAU+AT-NPD1, quando administrado em 3, 4, 5 e 6 horas, melhorou o comportamento em 50, 56, 33 e 26% e reduziu os volumes T2WI em 93, 90, 82 e 84% comparado ao veículo. Com a série 3 demonstramos que o tratamento com NPD1, RvD1 e terapia combinada fornece recuperação neurocomportamental de alto grau e diminui os volumes isquêmicos do núcleo e da penumbra mesmo quando administrado até 6 horas após o AVC. A terapia com um antagonista do receptor do fator ativador de plaquetas, LAU-0901, e o uso de docosanoides selecionados é mais eficaz do que a terapia única, proporcionando neuroproteção sinérgica, com mediadores lipídicos pró-homeostáticos restaurados e melhor recuperação neurológica. Em conjunto, nossos achados apoiam a terapia combinada como base para futuras terapêuticas para AVC isquêmico.

Palavras-chave: Docosanoides; MCAo; LAU-0901; NPD1; AT-NPD1; RvD1; neuroproteção.

**ABSTRACT: NEUROPROTECTION PROVIDED BY DOCOSANOIDS: A NEW
THERAPEUTIC STRATEGY IN EXPERIMENTAL ISCHEMIC STROKE**

Acute ischemic stroke triggers complex neurovascular, neuroinflammatory and synaptic changes. Neuroprotection to attenuate or block the ischemic cascade and save neuronal damage has been extensively explored in the treatment of ischemic stroke. However, despite increasing knowledge of regulatory, mechanistic, and imaging characterizations of ischemic penumbra, no effective neuroprotective therapy has been found. We tested the hypothesis whether the administration of LAU-0901 and some selected docosanoids (DHA, NPD1, AT-NPD1 and RvD1) in monotherapy or in combination, after middle carotid artery occlusion (MCAo), would lead to neurological recovery. Male Sprague-Dawley rats received were protected by MCAo and after the period established by the experimental series performed (between 2 and 6 h) the substances were administered. Behavioral tests, ex vivo MRI and lipidomic analysis were performed a few days later to assess the lesion characteristics. Series 1 was divided into three protocols: (LAU-0901+NPD1, 14d), (LAU-0901+AT-NPD1, 3d) and (LAU-0901+DHA, 1d). In series 2 and 3, dose-response and therapeutic window studies were carried out, respectively, for LAU, NPD1 and AT-NPD1, and RvD1 and NPD1, alone or combined and at different dosages. In series 1 it was observed that combinatorial groups improved behavior compared to NPD1, AT-NPD1 or DHA treatments alone. Total lesion volumes were reduced with LAU-0901+NPD1 by 62% and LAU-0901+AT-NPD1 by 90% of treatments versus vehicle groups. LAU-0901 and LAU-0901+DHA increased the production of vasoactive lipid mediators (prostaglandins: PGE₂, PGF₂- α , 6-keto-PGF₁- α and PGD₂), as well as an inflammatory regulatory mediator hydroxyoctadecadienoic acid. In contrast, LAU-0901 and LAU-0901+DHA decreased the production of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, a pro-inflammatory mediator. In series 2, LAU and AT-NPD1 treatments alone improved behavior by 40–42% and 20–30%, respectively, and LAU+AT-NPD1 by 40% compared to the vehicle group. T2-weighted image volumes (T2WI) were reduced with all doses of LAU and AT-NPD1 by 73–90% and 67–83% and LAU+AT-NPD1 by 94% compared to vehicle. In the therapeutic window, LAU+AT-NPD1, when given at 3, 4, 5, and 6 hours, improved behavior by 50, 56, 33, and 26% and included T2WI volumes by 93, 90, 82, and 84% compared to vehicle. With series 3 we demonstrated that treatment with NPD1, RvD1 and combined therapy provides high-grade neurobehavioral recovery and decreases ischemic core and penumbra volumes even when administered up to 6 hours after stroke. Therapy with a platelet activating factor receptor antagonist, LAU-0901, and the use of selected docosanoids is more effective than therapy alone, providing synergistic neuroprotection, with restorative, prohomeostatic lipid mediators and improved neurological recovery. Taken together, our findings support combination therapy as the basis for future ischemic stroke therapies.

Keywords: Docosanoids; MCAo; LAU-0901; NPD1; AT-NPD1; RvD1; neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Áreas de núcleo isquêmico e penumbra que surgem após a instalação do dano do AVC	23
Figura 2 - Cascatas de sinalização apoptótica após isquemia cerebral	32
Figura 3 - O papel do DHA e seus derivados na homeostase	37
Figura 4 - Estrutura química de LAU-0901	38
Figura 5 - Inibição da sinalização inflamatória e ativação de PAF-R induzida por lesão de I/R por LAU-0901 e AT-NPD1	39
Figura 6 - Destino das cadeias acílicas poliinsaturadas de fosfolipídios de membrana	41
Figura 7 - Preparação para o procedimento cirúrgico de oclusão da artéria cerebral média (MCAo) em ratos	49
Figura 8 - Oclusão da artéria cerebral média (MCAo) por filamento intraluminal	50
Figura 9 - Oclusão da artéria cerebral média (MCAo) por filamento intraluminal	51
Figura 10 - Avaliação neurocomportamental do reflexo postural	53
Figura 11 - Avaliação neurocomportamental da resposta de membros anteriores induzidos	53
Figura 12 - Protocolo 1 da série 1	55
Figura 13 - Protocolo 2 da série 1	56
Figura 14 - Protocolo 3 da série 1	56
Figura 15 - Estudo de dose-resposta da série 2	57
Figura 16 - Estudo de janela terapêutica da série 2	58
Figura 17 - LAU-0901 + NPD1 melhora o comportamento 14 dias após o AVC	62
Figura 18 - LAU-0901 (30mg/kg) + NPD1 (333 µg/kg) reduz os volumes de lesões de AVC derivadas da ressonância magnética	63
Figura 19 - LAU-0901 + AT-NPD1 desencadeada por aspirina é protetora 3 dias após o AVC	65
Figura 20 - Associação de LAU-0901 + DHA melhora o comportamento e modula a	

resposta inflamatória 1 dia após o AVC	67
Figura 21 - Estudo Dose-Resposta: LAU-0901, AT-NPD1 e sua combinação melhoraram a recuperação funcional após MCAo	71
Figura 22 - Tempo de recuperação das reações táteis (dorsais e laterais) e proprioceptivas de posicionamento dos membros anteriores	72
Figura 23 - LAU-0901, AT-NPD1 e sua combinação atenuaram os volumes das lesões de ressonância magnética e o núcleo isquêmico e a penumbra após o AVC	74
Figura 24 - Estudo da janela terapêutica. LAU-0901, AT-NPD1 e sua combinação melhoram os escores neurológicos quando administrados até 6 h após MCAo ..	77
Figura 25 - LAU-0901 (60mg/kg), AT-NPD1 (222µg/kg) e sua combinação reduzem as lesões de ressonância magnética e protegem o núcleo isquêmico e a penumbra	78
Figura 26 - Os volumes de lesão cortical, subcortical e total foram calculados a partir de mapas T2WI; LAU-0901 (60mg/kg) + AT-NPD1 (222µg/kg)	79
Figura 27 - A dose-resposta mostra que NPD1, RvD1 e sua combinação melhoraram a recuperação funcional após MCAo	81
Figura 28 - A janela terapêutica revela que NPD1 (222µg/kg), RvD1 (222µg/kg) e sua combinação melhoraram os déficits neurológicos quando administrados até 6 h após MCAo	84
Tabela 1 - Distribuição dos escores neurológicos dos testes comportamentais	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIF	Fator indutor de apoptose
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
AT-NPD1	Neuroprotectina D1 desencadeada por aspirina
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
Chk 1	<i>Checkpoint</i> quinase 1
Chk 2	<i>Checkpoint</i> quinase 2
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CREB	Proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DHA	Ácido docosahexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERCC2	Grupo 2 de genes de reparação da excisão cruzada complementar
EROs	Espécies reativas de oxigênio
et al	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i> , agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, que é responsável por proteger a saúde pública, garantindo a segurança, eficácia e proteção de medicamentos humanos e veterinários, produtos biológicos, dispositivos médicos, abastecimento de alimentos de nossa nação, cosméticos e produtos que emitem radiação
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
g	Gramas
GSH	Glutathione
GPX	Glutathione peroxidase
HNE	4-hidroxinonenal
HODE	Ácido hidroxi-octadecadienóico

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
I/R	Isquemia/reperfusão
LAU-0901	Ácido 2,4,6-trimetil-1,4-di-hidro-piridina-3,5-dicarboxílico
LPO	Peroxidação lipídica
MCAo	Oclusão da artéria cerebral média
MDA	Malonaldeído
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MRI	Imagem de ressonância magnética, do inglês <i>magnetic resonance imaging</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPD1	Neuroprotectina D1
OGD/R	Privação de oxigênio-glicose/reoxigenação
OGG1	8-oxoguanina glicosilase
OH ⁻	Radical hidroxila
O ²⁻	Ânion superóxido
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAF-R	Receptor do fator ativador de plaquetas
PARP-1	Poli (ADP-ribose) polimerase-1
PIKK	Quinases relacionadas à fosfatidilinositol-3 quinase
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PROACT	Ensaio Clínico Prospectivo Randomizado de Anticoagulação na válvula X
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂ - ^α	Prostaglandina G ₂ - ^α
RM	Ressonância magnética
r-proUK	Trombólise arterial com o trombolítico seletivo pró-uroquina recombinante
RvD1	Resolvina D1
SNC	Sistema Nervoso Central

SOD	Superóxido dismutase
TNF	Fator de necrose tumoral
t-PA	Ativador de tecido plasminogênio
T2WI	Imagem ponderada em T2, do inglês <i>T2-weighted image</i>
XPB	Xeroderma pigmentoso grupo D
XRCC1	Proteína 1 de complementação cruzada de reparo de raios-x
µg/kg	Micrograma por kilograma
12-HETE	Ácido 12-hidroxi-eicosatetraenoico
12/15-LOX	12/15-lipoxigenase
17R-HpDHA	Derivado de DHA contendo 17R-hidroperóxi
~	Aproximadamente
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
<	Menor
≤	Menor ou igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	AVC	22
2.1.1	<i>AVC isquêmico</i>	25
2.1.2	<i>AVC isquêmico agudo</i>	26
2.1.3	<i>Mecanismos envolvidos no AVC</i>	27
2.1.4	<i>Tratamento</i>	35
2.1.5	<i>Manejo clínico do AVC</i>	43
3	JUSTIFICATIVA	46
4	OBJETIVOS	47
4.1	Geral	47
4.2	Específicos	47
5	MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1	Animais e aspectos éticos	48
5.2	Modelo experimental	48
5.2.1	<i>Anestesia e preparação cirúrgica</i>	48
5.2.2	<i>Preparo do fio de sutura para oclusão da artéria cerebral média</i>	49
5.2.3	<i>Modelo de isquemia in vivo: Oclusão transitória da artéria cerebral média (MCAo)</i>	50
5.3	Análises neurocomportamentais	51
5.4	Aquisição de ressonância magnética e análise dos volumes totais da lesão, núcleo e penumbra	54
5.5	Protocolos experimentais e tratamentos	54
5.5.1	<i>Drogas utilizadas</i>	54
5.5.2	<i>Séries experimentais</i>	55
5.5.2.1	<i>Primeira série de experimentos</i>	55
5.5.2.1.1	<i>Amostragem cerebral e análise lipidômica</i>	56
5.5.2.2	<i>Segunda série de experimentos</i>	57
5.5.2.2.1	<i>Estudo de dose-resposta</i>	57
5.5.2.2.2	<i>Estudo de janela terapêutica</i>	57
5.5.2.3	<i>Terceira série de experimentos</i>	58
5.5.2.3.1	<i>Estudo de dose-resposta</i>	59

5.6	Análise estatística	59
6	RESULTADOS	61
6.1	Primeira série de experimentos	61
6.1.1	<i>Variáveis fisiológicas e mortalidade</i>	61
6.1.2	<i>LAU - 0901 + neuroprotectina D1 melhorou a função comportamental e atenuou o dano cerebral isquêmico 14 dias após oclusão da artéria cerebral média</i>	61
6.1.3	<i>LAU-0901 + AT-neuroprotectina D1 forneceu neuroproteção superior 3 dias após a oclusão da artéria cerebral média</i>	64
6.1.4	<i>LAU-0901 + ácido docosahexaenóico modula a regulação do fluxo sanguíneo cerebral e a sinalização inflamatória, o que leva à recuperação neurológica 1 dia após a oclusão da artéria cerebral média</i>	66
6.2	Segunda série de experimentos	69
6.2.1	<i>Variáveis fisiológicas e mortalidade</i>	69
6.2.2	<i>Dose-resposta</i>	69
6.2.3	<i>Janela terapêutica</i>	76
6.3	Terceira série de experimentos	80
6.3.1	<i>NPD1 + RvD1 dose-resposta e janela terapêutica demonstram neuroproteção melhorando o comportamento e diminuindo a lesão de AVC em T2WI</i>	80
6.3.2	<i>Dose-resposta</i>	80
7	DISCUSSÃO	86
8	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXO A – APROVAÇÃO DA INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)	115
	APÊNDICE A – ARTIGO 1 PUBLICADO	116
	APÊNDICE B – ARTIGO 2 PUBLICADO	117
	APÊNDICE C – ARTIGO 3 PUBLICADO	118
	APÊNDICE D – ARTIGO 4 PUBLICADO	119
	APÊNDICE E – ARTIGO 5 PUBLICADO	120
	APÊNDICE F – ARTIGO 6 PUBLICADO	121
	APÊNDICE G – ARTIGO 7 PUBLICADO	122
	APÊNDICE H – ARTIGO 8 PUBLICADO	123

APÊNDICE I – CAPÍTULO DE LIVRO 1 PUBLICADO	124
APÊNDICE J – CAPÍTULO DE LIVRO 2 PUBLICADO	125

1 INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de óbito e de incapacidade permanente em todo o mundo. Um dos fatores que tem levado ao aumento da sua incidência é o crescimento acentuado da expectativa de vida da população idosa (PAUL; CANDELARIO-JALIL, 2021).

Outros fatores associados ao risco de desenvolver AVC são aterosclerose de grandes vasos, doença de pequenos vasos, cardioembolismo e uso de determinados medicamentos, e alguns dos mecanismos responsáveis são a disfunção endotelial, alteração da coagulação, fibrinólise e promoção de fatores de risco vascular (GIROLAMI *et al.*, 2017).

O conhecimento dos riscos e dos mecanismos envolvidos nessa patologia podem ajudar mais adequadamente na decisão terapêutica a ser aplicada após um evento isquêmico cerebral. Apesar dos avanços nas pesquisas, as opções de tratamento para o AVC são limitadas, pois não abordam a resposta imunológica associada. As lesões que ocorrem no local são consequência de uma cascata de eventos bioquímicos e desregulação de múltiplas vias neuroinflamatórias que levam ao dano celular e à morte neuronal. Esses danos no sistema neurológico resultam em sequelas que podem afetar de maneira permanente os sobreviventes de isquemia cerebral (BELAYEV *et al.*, 2020; BELAYEV; REID; BAZAN, 2023).

Os resultados dos tratamentos envolvem o restabelecimento do fluxo sanguíneo para o tecido isquêmico, com a reintrodução de oxigênio aumentando temporariamente a lesão devido à geração de mediadores inflamatórios e níveis tóxicos de radicais livres oxidativos, interrupção da síntese de proteínas e, eventualmente, morte celular (SAKLANI *et al.*, 2022). Portanto, opções de tratamento potencialmente bem-sucedidas são necessárias para abordar vários mediadores críticos da morte neuronal.

A complexidade da progressão do AVC tem levado o seu tratamento a ser realizado com o uso da terapia medicamentosa combinada, pois tem se mostrado mais promissor do que regimes convencionais de drogas de classe única. Algumas combinações farmacológicas exibem sinergismo e necessitam do uso de doses mais baixas que diminuem a ocorrência de efeitos colaterais adversos e apresentam uma janela de tratamento mais estendida (SALEH *et al.*, 2014).

A terapia combinada tornou-se cada vez mais atraente nos últimos anos, à medida que o reconhecimento da complexidade da progressão do AVC se tornou mais evidente (LÖSCHER; KLEIN, 2022). Algumas combinações de drogas apresentam potencialização farmacológica (ou seja, sinergismo), o que pode resultar em doses menores, poucos efeitos

colaterais adversos e uma janela de tratamento estendida (ALEKSIC *et al.*, 2019).

A inflamação é atualmente considerada um alvo principal para o desenvolvimento de novas terapias para AVC (LAMBERTSEN; FINSEN; CLAUSEN, 2019). Vários estudos pré-clínicos e clínicos de prova de conceito sugeriram a eficácia de intervenções farmacológicas que visam a inflamação pós-AVC. A atividade biológica de LAU-0901, antagonista do fator ativador de plaquetas - PAF (ácido 2,4,6-trimetil-1,4-di-hidro-piridina-3,5-dicarboxílico) e AT-NPD1 (neuroprotectina D1 desencadeada por aspirina) devido à ativação ou modulação específica de vias de sinalização foi investigada. O estudo de LAMBERTSEN, FINSEN e CLAUSEN (2019) questionou se a inibição articular e a resolução da inflamação de ambos os processos seriam mais neuroprotetoras do que qualquer um deles isoladamente. Evidências emergentes sugerem que as plaquetas contribuem crucialmente para a inflamação e as respostas imunes. O PAF (fator ativador de plaquetas) é um potente regulador fosfolipídico da inflamação que exerce seu efeito via ligação ao PAFR específico. O PAF é fundamental nos sistemas imunológicos central e periférico e pode mediar a agregação plaquetária e as funções leucocitárias (HUG *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021); tem funções biológicas abrangentes, como promover a síntese de citocinas e ativar sistemas de agregação plaquetária (ZHAO *et al.*, 2021). PAF-R é uma proteína G acoplada a sete receptores transmembranares que ativam múltiplas vias de sinalização intracelular e existe na micróglia, neurônios e astrócitos no SNC (LIU *et al.*, 2017). Uma vez liberado, a ativação do PAF-R resulta em inflamação aguda, que pode contribuir para a manifestação clínica da lesão de isquemia-reperfusão (I/R) (SOUZA *et al.*, 2003). Muitos pesquisadores investigaram a relação dos mecanismos subjacentes porque a inflamação é influenciada pelo delicado equilíbrio entre a ativação do PAF/PAF-R (receptor do fator ativador de plaquetas) e a piroptose, que é um tipo de morte celular inflamatória que ocorre em resposta à infecção por patógenos intracelulares. Foi demonstrado que: a deficiência de PAF-R promoveu neuroproteção na isquemia cerebral global em camundongos PAFR-/-, (TOSCANO *et al.*, 2016); o nocaute de PAF-R diminuiu as expressões de IL-1 β , TNF (fator de necrose tumoral) e IL-6 no hipocampo, preveniu a neuroinflamação e disfunção após lesão cerebral traumática em camundongos (YIN *et al.*, 2017); e redução de EROs (espécies reativas de oxigênio) induzida por deleção de PAF-R após lesão de I/R miocárdica em camundongos (WANG; HAN; JIA, 2018).

Embora os níveis basais de PAF sejam praticamente indetectáveis em tecidos em repouso, esse fator é rapidamente sintetizado no cérebro durante a isquemia, medeia a liberação do neurotransmissor glutamato no hipocampo e ativa seletivamente uma rede de expressão gênica de resposta precoce, incluindo a rápida indução de COX-2 (ciclo-oxigenase-

2) e $\text{TNF-}\alpha$ (BAZAN, 2005a). Durante a isquemia, as taxas de síntese e degradação de PAF não mantêm mais um tamanho de *pool* de PAF modulado; esse fator se acumula e se torna um mensageiro pró-inflamatório e um mediador da neurotoxicidade (BAZAN, 2005a). O nível de PAF-R aumentou após uma hora de MCAo (oclusão da artéria carótida média) em camundongos e lesão OGD/R (privação de oxigênio-glicose/reoxigenação), indicando que o PAF-R se envolveu em lesão cerebral isquêmica (ZHAO *et al.*, 2021).

Foi demonstrado que uma supressão robusta da sinalização pró-inflamatória foi alcançada pelo uso de LAU-0901, uma pequena molécula antagonista do PAF-R (BAZAN, 2005a). A liberação do fator ativador de plaquetas (PAF, mais precisamente 1-O-alkyl-2-acil-sn-3-fosfocolina) pode levar a lesões cerebrais substanciais ao aumentar o cálcio intracelular, interromper a barreira hematoencefálica, reduzir o fluxo sanguíneo cerebral e ativar leucócitos (KATO *et al.*, 1994; BAZAN, 2005a). A liberação excessiva de PAF de células imunes ativadas desencadeia lesão neuronal, e a inibição desse processo desempenha um papel crítico na sobrevivência neuronal e na prevenção de lesão cerebral isquêmica (BAZAN, 2003).

LAU-0901 é um antagonista do PAF-R altamente potente e seletivo que foi examinado em modelos de isquemia cerebral focal em ratos e camundongos (BELAYEV *et al.*, 2012). Foi demonstrado que essa substância melhorou os déficits comportamentais e reduziu os volumes de infarto quando administrado 2 h após a MCAo (BELAYEV *et al.*, 2008; SERHAN *et al.*, 2011; BELAYEV *et al.*, 2012). Além disso, o LAU-0901 também conferiu neuroproteção duradoura em animais que sobreviveram por várias semanas após o AVC (BELAYEV *et al.*, 2009).

Ácidos graxos e mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos podem potencialmente influenciar o sistema imunológico (DE JONG *et al.*, 2014). Os mediadores lipídicos são produzidos por meio de vias biossintéticas conservadas envolvendo enzimas específicas, que funcionam em precursores lipídicos liberados das membranas celulares (DE JONG *et al.*, 2014). Existem várias famílias de mediadores lipídicos que podem ser divididas em mediadores lipídicos pró-inflamatórios e mediadores pró-resolutivos mais especializados. Os mediadores lipídicos pró-inflamatórios incluem prostaglandinas e leucotrienos, enquanto os mediadores pró-resolutivos mais especializados têm lipoxinas, resolvinas, maresinas e protectinas (SERHAN, 2007). Os mediadores pró-resolutivos mais especializados derivados do ácido docosahexaenóico (DHA) e do ácido eicosapentaenoico (EPA), incluindo famílias de resolvinas e protectinas, têm desempenhado um papel significativo na resolução da inflamação (RECCHIUTI; SERHAN, 2012). Mecanismos de ação completos para os mediadores pró-resolutivos mais especializados não foram identificados, mas dados indicam

que receptores acoplados à proteína G em leucócitos se ligam a esses tipos de mediadores para reduzir a infiltração e promover regeneração tecidual (RECCHIUTI; SERHAN, 2012). Assim, os mediadores pró-resolutivos mais especializados endógenos, particularmente aqueles derivados do ácido graxo ômega-3, podem representar um alvo valioso na mudança do equilíbrio dos processos neuroinflamatórios de condições de inflamação para condições de resolução de inflamação no SNC danificado (ASATRYAN; BAZAN, 2017).

Efeitos neuroprotetores e aceleração da resolução inflamatória foram alcançados pela administração de docosanoides bioativos, mediadores lipídicos endógenos derivados do DHA) um dos principais ácidos graxos ômega-3 no cérebro após I/R cerebral. A neuroprotectina D1 (NPD1) e a AT-NPD1 são docosanoides sintéticos amplamente estudados. Descobriu-se que eles promovem a sobrevivência de células neuronais com importante atividade antiinflamatória (BAZAN, 2009; BAZAN *et al.*, 2012). A atividade biológica de NPD1 e AT-NPD1 foi atribuída à ativação ou modulação específica de vias de sinalização associadas ao sistema imunológico, inflamação, células sobrevivência e/ou interações célula-célula (SERHAN *et al.*, 2011).

Evidências crescentes sugerem que a resolução da inflamação não é um processo passivo devido à exaustão da sinalização, mas sim uma interação orquestrada por muitos mediadores, que suprimem ativamente a resposta inflamatória (BELAYEV *et al.*, 2020). As principais etapas do processo incluem a remoção de células mortas, o desenvolvimento de um ambiente anti-inflamatório e a geração de fatores pró-sobrevivência que promovem a reconstrução e reparo tecidual (BELAYEV *et al.*, 2020). A modulação das vias dos eicosanoides e dos mediadores lipídicos foi abordada pela combinação de LAU-0901 com DHA, que ativa as vias de sobrevivência celular com atividade antiinflamatória e neuroprotetora no cérebro (EADY *et al.*, 2013).

A eficácia terapêutica da terapia combinada LAU-0901 com docosanoides selecionados (DHA, NPD1 e AT-NPD1) foi investigada usando um modelo de rato bem estabelecido de isquemia transitória, com o auxílio de ressonância magnética (RM) multimodal, ensaios neurocomportamentais e análise lipidômica (BELAYEV *et al.*, 1996). Até então nenhum estudo anterior havia utilizada esta nova abordagem combinatória para o tratamento do AVC isquêmico.

Surgiu, então, esta nova abordagem para direcionar farmacologicamente e resolver disrupções neuroinflamatórias para atingir a integridade da rede neuronal sustentada e a recuperação neurológica. Para abordar os componentes patogênicos multifacetados do AVC, foi proposta uma terapia combinada para bloquear eventos pró-inflamatórios (BELAYEV *et*

al., 2020; enquanto promove simultaneamente neuroproteção e resolução da inflamação (SERHAN; YACOUBIAN; YANG, 2011; BELAYEV *et al.*, 2020).

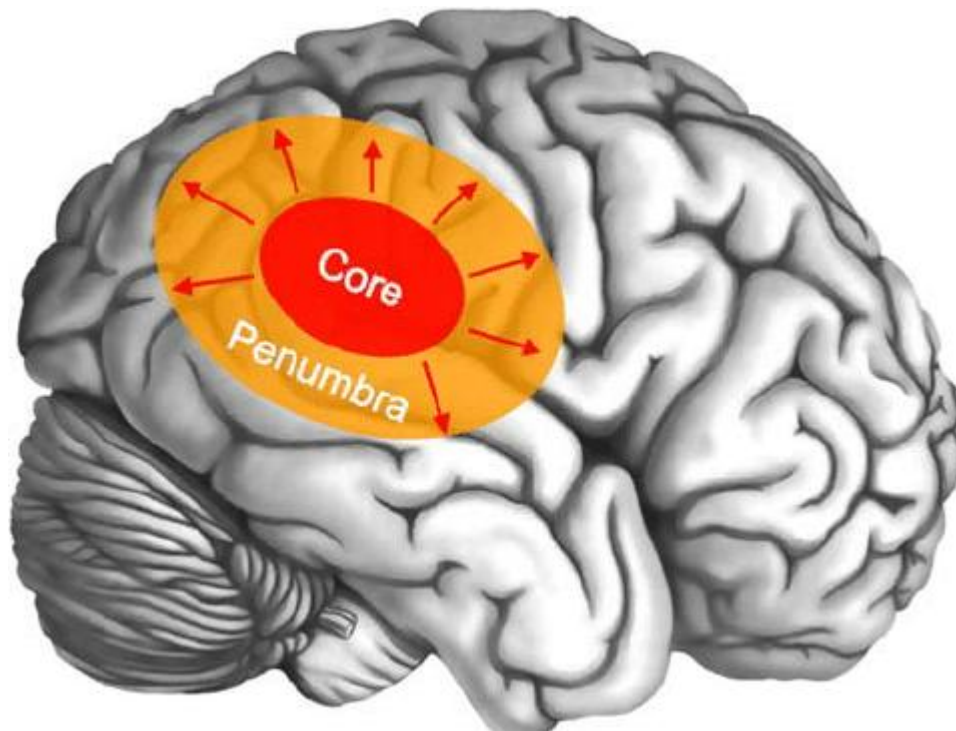
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AVC

O cérebro depende de um suprimento sanguíneo contínuo e regulado para manter sua integridade funcional (PAPASILEKAS *et al.*, 2021). Este órgão recebe cerca de 15% do débito cardíaco e consome mais de 20% dos substratos metabólicos (oxigênio e glicose), embora os neurônios tenham reservas de energia muito limitadas. Isso sugere que os neurônios extraem oxigênio e glicose do sangue conforme necessário para apoiar a função neural contínua para atender às demandas fisiológicas impostas pela ativação neural (JAIN; LANGHAM; WEHRLI *et al.*, 2010).

A redução ou cessação do fluxo sanguíneo no cérebro pode produzir diferentes níveis de danos dependendo do tempo decorrido, resistência celular e magnitude da isquemia. E há a ativação de uma cascata muito complexa de eventos celulares e moleculares inter-relacionados com um perfil de sobreposição temporal que evolui ao longo de minutos, horas ou dias, induzindo lesões em todos os tipos de células e danos que podem variar de transitória a irreversível (como a morte celular) (MARTINEZ-CORIA *et al.*, 2021). Este evento produz duas áreas diferentes de dano: o núcleo isquêmico e a penumbra (**Figura 1**). No núcleo isquêmico, o fluxo sanguíneo é abruptamente reduzido e as células são permanentemente lesadas e morrem rapidamente por necrose; o tamanho dessa área dependerá principalmente da duração e magnitude da isquemia e da localização do AVC. Já a penumbra está localizada ao redor do núcleo isquêmico. Esta zona é perfundida por vasos sanguíneos colaterais que permitem células que estão estruturalmente intactas, mas funcionalmente enfraquecidas (BROUNS; DE DEYN, 2009; DEB; SHARMA; HASSAN, 2010).

Figura 1. Áreas de núcleo isquêmico e penumbra que surgem após a instalação do dano do AVC.



Um núcleo de tecido com infarto irreversível (zona vermelha) é circundado por uma região periférica de tecido isquêmico, mas potencialmente recuperável, na fase inicial do AVC isquêmico agudo, referido como penumbra (zona laranja). Sem recanalização precoce, o núcleo do infarto se expande gradualmente para incluir a penumbra (setas vermelhas).

Fonte: Kloska *et al.*, 2010.

As células que foram funcionalmente prejudicadas durante esses eventos podem ser lentamente incorporadas ao AVC isquêmico ou salvas. Alguns estudos mostraram que existe certo grau de recuperação espontânea nas semanas ou meses após um AVC em humanos e camundongos (BERGSMA; ELSHOUT; VAN DEN BERG, 2017; DELAVARAN *et al.*, 2017). Essa recuperação envolve mudanças adaptativas em neurônios e células gliais para reverter parcialmente as alterações causadas por um AVC isquêmico. Muitos fatores podem atrasar ou prejudicar a recuperação, por exemplo, suscetibilidade tecidual, idade e comorbidades (MARTINEZ-CORIA *et al.*, 2021).

O AVC é a segunda maior causa de morte em todo o mundo, com uma taxa de mortalidade anual de cerca de 5,5 milhões. É também a principal causa de incapacidade em todo o mundo, com 50% dos sobreviventes ficando com deficiência crônica (DONKOR, 2018; KATAN; LUFT, 2018). O AVC foi a principal causa de incapacidades e déficits cognitivos e a quinta principal causa de mortalidade nos EUA em 2017. Além disso, o AVC

isquêmico representou 5,2% de todas as mortes em todo o mundo em 2015 (ZHAO *et al.*, 2022). No Brasil essa patologia é a principal causa de incapacidade da população com idade acima de 50 anos, sendo responsável por 10% do total de desfechos fatais, 32,6% dos óbitos com causas vasculares e 40% das solicitações de aposentadorias precoces. Nessa configuração, o país faz parte dos dez primeiros com maiores índices de mortalidade por AVC (LOBO *et al.*, 2021).

Novas pesquisas indicam que a ocorrência de AVC está aumentando, com uma em cada quatro pessoas em todo o mundo sofrendo AVC durante a vida (PAUL; CANDELARIO-JALIL, 2021). Uma população envelhecida, juntamente com a carga de fatores de risco acumulados, contribui para esse aumento no risco de AVC ao longo da vida. Além disso, o aumento do status socioeconômico nos países em desenvolvimento levou a um aumento epidêmico dos fatores de risco para AVC em adultos jovens (KATAN; LUFT, 2018). Esses fatores de risco incluem fibrilação atrial, hipertensão, hiperlipidemia, hiperhomocisteinemia, diabetes, tabagismo, falta de atividade física, dieta pouco saudável, obesidade abdominal e consumo de álcool (O'DONNELL *et al.*, 2016; BOEHME; ESENWA; ELKIND, 2017). No entanto, a hipertensão é de longe o fator de risco mais potente para AVC, responsável por ~54% de todos os AVCs (WAJNGARTEN; SILVA, 2019; GORELICK *et al.*, 2020). A prevalência de hipertensão em adultos americanos é estimada em ~45,4%, com uma frequência geral de ~71,8% na idade de 60 anos ou mais (DORANS *et al.*, 2018; BENJAMIN *et al.*, 2019). A carga absoluta de hipertensão em adultos americanos aumentou de ~86,6 milhões em 1999 para ~108 milhões em 2015 (DORANS *et al.*, 2018). Notavelmente, a carga global de hipertensão aumentou de 442 milhões em 1990 para 874 milhões em 2015, um aumento de ~97%, e foi previsto que nas próximas duas décadas a incidência de AVC aumentará em outros ~24,9% (FOROUZANFAR *et al.*, 2017; HUFFMAN; LLOYD-JONES, 2017). O AVC é classificado principalmente como de natureza isquêmica ou hemorrágica. O AVC isquêmico é causado pela redução do suprimento de sangue para uma determinada região do cérebro devido à obstrução de um vaso sanguíneo. Em contraste, o AVC hemorrágico ocorre devido à ruptura de um vaso sanguíneo no cérebro causando sangramento no cérebro ou no espaço subaracnóideo (DONNAN *et al.*, 2008; AMARENCO *et al.*, 2009). Vários estudos estabeleceram que o AVC isquêmico é a forma mais prevalente de AVC em todo o mundo (DONKOR, 2018; SARFO *et al.*, 2018; PAUL; CANDELARIO-JALIL, 2021).

2.1.1 AVC isquêmico

O AVC isquêmico após oclusão da artéria cerebral é uma das principais causas de incapacidade crônica em todo o mundo, e ainda faltam métodos eficazes para melhorar a recuperação funcional após a ocorrência desse evento. Após o AVC isquêmico, uma grave escassez de suprimento de sangue para o cérebro leva ao suprimento insuficiente de oxigênio para esse órgão, o que, por sua vez, leva à morte neuronal. As respostas inflamatórias na interface sangue-endotélio dos capilares cerebrais são a base do dano tecidual isquêmico. Além disso, as interações inflamatórias na interface sangue-endotelial, incluindo moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e glóbulos brancos, são cruciais para a patogênese da lesão tecidual no infarto cerebral. No entanto, apesar de um extenso trabalho de pesquisa ter sido feito, os mecanismos exatos dos danos causados pelo AVC não são totalmente compreendidos, mas está claro que as interleucinas desempenham um papel importante na progressão da doença isquêmica do AVC (ZHU *et al.*, 2022).

A progressão do dano cerebral isquêmico após o fluxo sanguíneo prejudicado envolve o desenvolvimento inicial de um núcleo de tecido necrótico lesado irreversivelmente dentro do leito vascular afetado, seguido pelo desenvolvimento de lesão de fase tardia na área peri-infarto, uma área potencialmente recuperável ao redor do núcleo (ASTRUP; SIESJÖ; SYMON, 1981; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; RAMOS-CABRER *et al.*, 2011).

A causa patológica básica do AVC isquêmico é a trombose intravascular, que pode resultar em necrose do tecido cerebral e déficits neuronais focais. Existem três principais causas conhecidas de AVC isquêmicos: 50% são causados por placas arterioscleróticas dos vasos cerebrais e ruptura da placa arteriosclerótica, 20% são causados por infarto cerebral cardiogênico e 25% são causados por infartos lacunares de lesões de pequenos vasos. Além disso, os 5% restantes são devidos a outras causas excepcionais, como vasculite e dissecação arterial extracraniana (ZHAO *et al.*, 2022).

A fisiopatologia da lesão cerebral isquêmica abrange a ativação de uma série de cascatas de sinalização danosas. Privação de suprimento de oxigênio e glicose para o tecido cerebral leva à falha imediata das bombas e canais iônicos dependentes de energia, resultando na liberação de concentrações potencialmente tóxicas de neurotransmissores excitatórios e subsequente morte dos neurônios vulneráveis. A liberação excessiva do neurotransmissor excitatório glutamato é, sem dúvida, um elemento primordial que inicia a progressão do dano cerebral por meio da ativação de complexos de receptores pós-sinápticos N-metil-D-aspartato

(NMDA), dependentes de voltagem (tipo L) e quisqualato (Q) (PULSINELLI, 1992). A passagem de cálcio para o interior das células por meio desses receptores resulta na ativação de uma série de cascatas de sinalização intracelular (como, ativação da fosfolipase A2 citosólica e da NADPH oxidase, catálise do ácido araquidônico pela ciclooxigenase-2 e despolarização mitocondrial), culminando no aumento da geração de radicais livres (SUN; HORROCKS; FAROOQUI, 2007).

O estresse oxidativo e nitrosativo causado pelos radicais livres é ainda mais acelerado pela restauração do suprimento de oxigênio após a reperfusão, induzindo peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA durante a I/R (NELSON *et al.*, 1992; SUN *et al.*, 2018). Além disso, a liberação induzida pelo estresse oxidativo de moléculas de padrão molecular associado ao dano (DAMP) desencadeia uma resposta inflamatória envolvendo a ativação da micróglia intrínseca do cérebro, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e infiltração de células imunes periféricas (BANJARA; GHOSH, 2017; GÜLKE; GELDERBLUM; MAGNUS, 2018).

Há indícios de que a inflamação pós-isquêmica é responsável pelo avanço secundário da lesão cerebral e que a magnitude resultante do AVC com comorbidades depende da amplitude da resposta inflamatória (CHAMORRO *et al.*, 2012; VELTKAMP; GILL, 2016). Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia do AVC, o sucesso do tratamento continua sendo um grande desafio na medicina clínica. O desenvolvimento de estratégias de neuroproteção para proteger as células cerebrais da lesão de I/R, bem como para ampliar a janela de tempo para o tratamento trombolítico é, portanto, um objetivo importante (CHAMORRO *et al.*, 2016; PAUL; CANDELARIO-JALIL, 2021).

2.1.2 AVC isquêmico agudo

O AVC isquêmico agudo é um tipo de AVC isquêmico que pode causar danos cerebrais e neuronais graves em um tempo muito curto após o episódio isquêmico. Vários graus e tipos de danos cerebrais são causados por AVC isquêmico e infartos cerebrais, incluindo lesões de tecidos cerebrais e danos estruturais, morte e déficits neuronais, entre outros. Os sintomas clínicos desses tipos de danos podem ser observados em pacientes com patologias como a doença de Alzheimer, déficits funcionais motores, escore de quociente de inteligência prejudicado e déficits funcionais cognitivos múltiplos (atenção seletiva, memória de trabalho, processamento de informações, raciocínio abstrato e compreensão verbal), entre outros (HUI; TADI; PATTI, 2022).

De acordo com os resultados de estudos que examinaram os mecanismos e o manejo clínico do AVC isquêmico e infarto cerebral, existem mecanismos principais subjacentes às lesões neuronais causadas por AVC isquêmico e infartos cerebrais. A perda de neurônios induzida por isquemia e infartos é uma das causas mais diretas de lesões neuronais; com relação a esse mecanismo, os pesquisadores têm se concentrado nos processos de neuroproteção e regeneração, bem como em biomarcadores e vias moleculares relacionados. A obstrução vascular causada pela isquemia produz excessivamente espécies reativas de oxigênio (EROs), e foi demonstrado que o estresse oxidativo exacerba o dano neuronal e leva a déficits funcionais graves. As vias que reagem e aliviam o estresse oxidativo são amplamente investigadas para ajudar a diminuir as lesões neuronais. A inflamação induzida pela isquemia é um fator adicional que leva a mais dano neuronal após golpes. Portanto, manipular efetivamente as respostas imunes pode ajudar a reduzir as lesões neuronais (ZHAO *et al.*, 2022).

2.1.3 Mecanismos envolvidos no AVC

Investigações sobre AVC isquêmico e lesões neuronais indicaram que o dano neuronal é causado pela perda de neurônios, estresse oxidativo e respostas imunes. Vários biomarcadores e vias moleculares estão envolvidos no resgate de dano neuronal causado por AVC isquêmico e infarto cerebral (ZHAO *et al.*, 2022).

Modelos animais *in vivo* de AVC isquêmico e infartos cerebrais fornecem informações valiosas sobre os mecanismos subjacentes e possíveis terapias clínicas. O modelo da MCAo em modelos murinos é mais amplamente utilizado para estudos *in vivo*. Os modelos embólicos MCAo imitam de perto o AVC humano, >80% dos quais são causados por trombose ou embolia. A MCAo produz oclusão regenerativa nas artérias cerebrais médias e permite a reperfusão sem ressecção extracraniana da oclusão. Embora o mecanismo dessa rápida recuperação do fluxo sanguíneo seja diferente da fisiopatologia dos derrames humanos, esse modelo ainda pode simular de maneira louvável a aplicação clínica da trombólise mecânica, que pode ser mais amplamente aplicada em pacientes no futuro. Além disso, os diversos modelos de AVC embólico e AVC espontâneo podem simular de forma mais eficaz a condição real de AVC humano (BELAYEV *et al.*, 1996; MATUR *et al.*, 2022).

Diferentes modelos experimentais têm contribuído significativamente para o conhecimento atual sobre a fisiopatologia do AVC e suas consequências, e cada modelo causa diferentes alterações na microcirculação cerebral e respostas inflamatórias locais após a

isquemia. No entanto, esses modelos são acompanhados de maior instabilidade quanto ao tamanho e localização dos infartos. Por exemplo, tal instabilidade inclui ataques de AVC imprevisíveis em modelos de AVC espontâneo e condições de reperfusão imprevisíveis em modelos de AVC embólico (ZHAO *et al.*, 2022).

Ao produzir EROs em excesso, o AVC isquêmico promove o estresse oxidativo que é conhecido por causar danos generalizados pela oxidação de ácidos lipídicos, proteínas e DNA, o que acaba levando à morte celular (WOODRUFF *et al.*, 2011). Foi proposto que a medicina natural tenha efeitos neuroprotetores contra o dano oxidativo após o AVC, visando vias a montante da produção de EROs, diminuindo assim seus efeitos a jusante nas macromoléculas (GONG; SUCHER, 2002). A evidência de propriedades neuroprotetoras da medicina tradicional chinesa foi inferida principalmente por meios indiretos e é limitada a um número bastante pequeno de substâncias. No entanto, algumas das drogas podem representar uma fonte potencial para o isolamento de compostos neuroprotetores. Foi relatado que os ginsenosídeos aumentaram significativamente a sobrevivência de camundongos sob hipóxia aguda e protegeram o cérebro de lesões isquêmicas e de reperfusão (ZHANG; LIU, 1996). Os efeitos protetores dos ginsenosídeos na diminuição do Ca^{2+} intracelular foram atribuídos ao aumento da atividade da ATPase (JIANG; ZHANG, 1996). Além disso, os ginsenosídeos inibiram significativamente a geração de radicais livres pela xantina-xantina oxidase (LI; ZHANG; ZHANG, 1997). Efeitos neuroprotetores de inibição significativa na formação de peróxidos lipídicos no cérebro de ratos foram observados após tratamento com *Gastrodiae Rhizoma*, *Radix Salviae Miltiorrhizae* e tetrametilpirazina (CHE *et al.*, 1996; GONG; SUCHER, 2002). Outros estudos mostraram que a tetrandrina (que é um alcaloide natural de bisbenzilisquinolina) e seu derivado daurisolina (que é um dos alcaloides mais abundantes extraídos do rizoma de *Menispermum dauricum*) tiveram efeitos protetores significativos contra lesão isquêmica com maior proteção contra neurotoxicidade dependente de NO (CHE *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1998) e o efeito neuroprotetor da daurisolina foi mediado pelo bloqueio do influxo de Ca^{2+} nas células (LIU *et al.*, 1998).

O estresse oxidativo é considerado um fator primário de lesão cerebral na isquemia cerebral. A produção excessiva de EROs no corpo humano causa estresse oxidativo após o AVC. Posteriormente, o AVC estimula a peroxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando a danos no DNA e disfunção mitocondrial, o que acaba induzindo a morte celular no cérebro (JELINEK; JURAJDA; DURIS, 2021).

O tecido cerebral representa uma quantidade relativamente pequena em relação ao corpo, mas seu metabolismo de oxigênio é o mais ativo em comparação com o de outros

órgãos, tornando-o sensível à isquemia. O estresse oxidativo refere-se a um estado desequilibrado de oxidação e anti-oxidação no corpo e é considerado uma das principais causas de lesão cerebral após AVC isquêmico. Uma diminuição permanente ou transitória no fluxo sanguíneo cerebral normalmente ocorre após um AVC isquêmico, causando assim lesão do tecido cerebral e até mesmo a morte (DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE, 2008). Restaurar o fluxo sanguíneo é benéfico para o tratamento do AVC isquêmico, mas estudos mostraram que a reperfusão do fluxo sanguíneo induz lesão cerebral grave devido ao grande número de moléculas de EROs produzidas durante esse processo (CHEN, *et al.*, 2011), que causa danos a todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos (RANI *et al.*, 2016). As moléculas EROs desempenham um papel crítico na indução de danos relacionados ao estresse oxidativo, causando subsequentemente déficits neurológicos (FARACI, 2006; JIN; YANG; LI, 2010). Os principais tipos de moléculas de EROs incluem ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quando ocorre isquemia cerebral, o dano cerebral associado é causado pelo excesso de EROs por meio dos seguintes processos: interferência e inibição da síntese de proteínas, juntamente com o dano da estrutura do DNA; dano da estrutura mitocondrial, que prejudica a função respiratória e reduz a produção de energia; peroxidação lipídica (LPO) de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares e degradação de fosfolípidos, incapacitando ainda mais a pessoa afetada; e dano das células endoteliais, causando distúrbios da microcirculação do cérebro e aumentando a permeabilidade da BHE. Além da superprodução de EROs, uma defesa antioxidante diminuída também contribui para o dano oxidativo após o AVC. O corpo tem dois sistemas antioxidantes, ou seja, o sistema antioxidante enzimático, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione (GSH) e catalase (CAT), e o sistema antioxidante não enzimático, incluindo glutathione, melatonina, carotenoides, vitamina C e vitamina D. Assim, o estresse oxidativo induzido por AVC está principalmente associado à produção excessiva de EROs, e a principal abordagem para a terapia antioxidante dessa patologia é reduzir a produção de EROs, para eliminar as EROs existentes e para promover a defesa antioxidante (HONDA; KORGE; WEISS, 2005).

Moléculas de EROs altamente ativas degradam macromoléculas celulares, incluindo DNA, resultando em morte celular (THANNICKAL; FANBURG, 2000). O reparo prejudicado do DNA piora os resultados neurológicos no cérebro (SHIWAKU; OKAZAWA, 2015). O papel das enzimas do reparo por excisão de bases no AVC isquêmico não é bem compreendido. Sabe-se que altos níveis de ROS causam neurodegeneração, e surtos graves de ROS, como o causado pela reperfusão após AVC isquêmico, prejudicam a função neuronal.

Para se recuperar dessa lesão, os neurônios precisam de um sistema de reparo de DNA robusto para reparar o dano oxidativo, evitar a morte celular e preservar a função cerebral normal. Apesar desta forte ligação entre BER e o dano oxidativo agudo produzido durante a isquemia e reperfusão, há muitos poucos dados sobre o papel do reparo do DNA em pacientes com AVC humano ou modelos de AVC em animais (CANUGOVI *et al.*, 2013). Um polimorfismo em XPD (xeroderma pigmentoso grupo D), um gene de reparo por excisão de nucleotídeos, foi associado a um risco significativamente aumentado de AVC. Um estudo populacional realizado em Taiwan envolvendo grupos de fumantes e não fumantes mostrou que os polimorfismos de ERCC2 (grupo 2 de genes de reparação da excisão cruzada complementar) e XPD estavam associados ao risco de AVC de grande artéria aterosclerótica, e a expressão dos polimorfismos OGG1 (8-oxoguanina glicosilase) e ERCC2 simultaneamente elevaram os riscos desse tipo de AVC; além disso, esse risco foi elevado com o tabagismo em todos os grupos (SHYU *et al.*, 2012).

O dano e o reparo do DNA são críticos para a recuperação funcional após o AVC por meio de enzimas relacionadas ao reparo do DNA (LI *et al.*, 2018). O dano ao DNA ocorre em vários tipos de células neurovasculares, incluindo neurônios, micróglia, astrócitos e oligodendrócitos, juntamente com células endoteliais vasculares (LI *et al.*, 2019). O mecanismo de dano ao DNA está associado ao reconhecimento do dano ao DNA mediado pela quinase relacionada à fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), a translocação do fator indutor de apoptose (AIF) regulado pela poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), a translocação nuclear do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) e a degradação da enzima de reparo do DNA mediada por metaloproteinases de matriz (MMPs) (WANG *et al.*, 2011a; KUSAKABE *et al.*, 2019). Quinases relacionadas à fosfatidilinositol-3 quinase (PIKK) ativam as cascatas de danos ao DNA via fosforilação de proteínas de alvos a jusante, incluindo c-Abl, p53, *checkpoint* quinases (Chk1 e Chk2) e a variante de histona H2AX (MOUMEN *et al.*, 2013; CHOU *et al.*, 2015). A translocação de AIF da mitocôndria para o núcleo após isquemia cerebral induz morte celular apoptótica independente de caspase, que é regulado por PARP-1 (CAO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2016). Prevenir a ativação de PARP-1 pode proteger o tecido cerebral contra a apoptose celular mediada por dano oxidativo e induzido por I/R. A presença do AIF facilita a translocação do MIF para o núcleo dos neurônios, onde ele cliva o DNA genômico, resultando na morte celular (WANG *et al.*, 2016). A expressão anormal de MMPs desencadeia a expansão do infarto e a quebra da BHE. Além disso, após o AVC, as MMPs entram no núcleo dos neurônios e degradam as proteínas de

reparo do DNA nuclear, como XRCC1 (proteína 1 de complementação cruzada de reparo de raios-x) e OGG1, causando danos oxidativos ao DNA nos neurônios (HILL *et al.*, 2012).

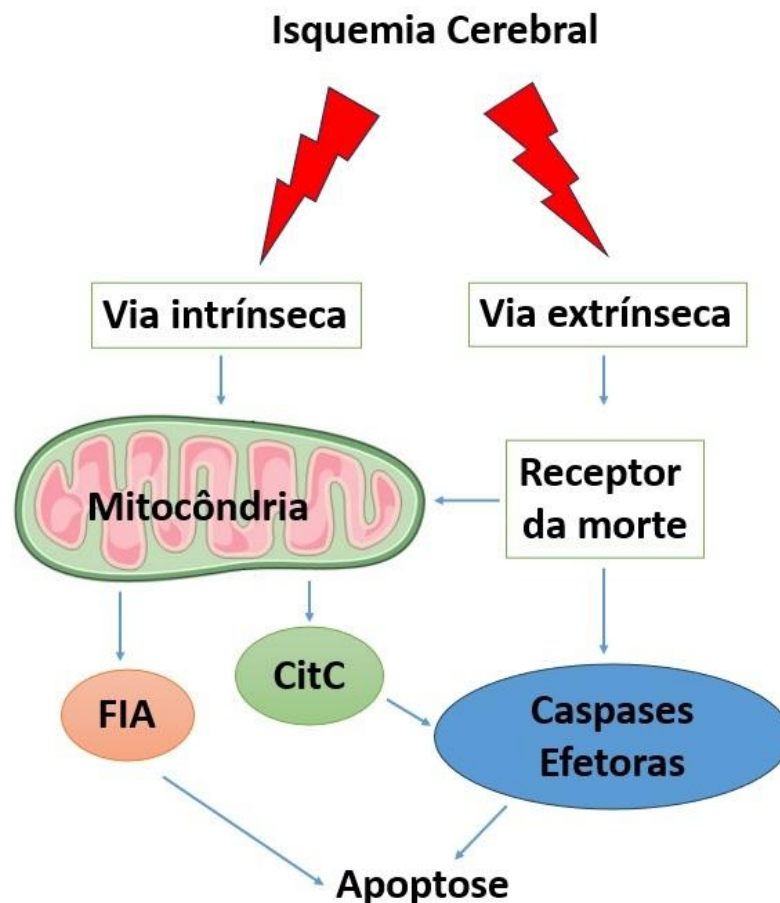
A formação de radicais livres de oxigênio e a reação de LPO no corpo estão em um equilíbrio coordenado e dinâmico, o que é essencial para a estabilização do metabolismo. A interrupção desse estado de equilíbrio causa uma série de distúrbios metabólicos, induzindo assim uma reação em cadeia de radicais livres de oxigênio e prejudicando as biomembranas e suas funções pelo LPO, resultando em dano celular. A oxidação induzida por EROs de biomembranas durante o LPO é baseada na reação de EROs com substâncias macromoleculares, como as cadeias laterais de ácidos graxos poliinsaturados e fosfolipídios interagindo com ácidos nucléicos, juntamente com enzimas e receptores de membrana embutidos em biomembranas, que reagem para formar peróxidos lipídicos, como malonaldeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE), que são todos tóxicos. Esse processo leva à lesão celular, alterando a fluidez e a permeabilidade da membrana celular. Foi relatado que o nível do MDA é aumentado após AVC isquêmico, sugerindo seu uso como um biomarcador para LPO. A diminuição do MDA indica uma melhoria da defesa antioxidante endógena que pode contribuir para a recuperação do equilíbrio dinâmico no cérebro (MARÍN-PRIDA *et al.*, 2013).

O dano mitocondrial é um evento patológico chave durante os estágios iniciais do AVC isquêmico (TOOMEY *et al.*, 2022). Especificamente, as mitocôndrias são a principal fonte de produção excessiva de EROs indutora de danos causada por AVC. A geração excessiva de EROs pela mitocôndria destrói a cadeia de transporte de elétrons, leva à diminuição da produção de ATP e, consequentemente, prejudica a função da mitocôndria, formando um ciclo vicioso (CHRISTOPHE; NICOLAS, 2006). Estudos sobre uma variedade de doenças neurológicas, incluindo AVC, investigaram o envolvimento do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial. Reduzir a geração de EROs fornece proteção contra o estresse oxidativo. Especialmente, uma redução da produção de EROs mitocondrial ou estresse oxidativo mitocondrial poderia aliviar a progressão do AVC isquêmico. Várias vias que regulam a função mitocondrial estão relacionadas à produção de EROs, indicando assim opções promissoras para a neuroproteção visando tais vias, incluindo aquelas que dependem da proteína quinase A (PKA)/Proteína de ligação do elemento de resposta ao monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (CREB), PKA/CREB, e 12/15-lipoxigenase (12/15-LOX). A ativação de PKA desencadeia a fosforilação de CREB, que preserva a saúde mitocondrial, protegendo assim os neurônios da lesão por isquemia ao limitar a produção de EROs. Além disso, a inibição da via 12/15-LOX também pode ser benéfica no AVC. No geral, manter a

saúde mitocondrial é essencial para o tratamento do AVC (VAN LEYEN *et al.*, 2006; XUE *et al.*, 2019).

A apoptose é a forma mais comum de morte celular programada em organismos multicelulares e pode ser desencadeada pela via intrínseca ou extrínseca (**Figura 2**). As alterações morfológicas iniciais na apoptose envolvem o encolhimento celular e a condensação citoplasmática, seguidas pela quebra da membrana nuclear e formação de corpos apoptóticos, tudo o que ocorre sem qualquer resposta inflamatória (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). É importante ressaltar que essas características da apoptose também foram observadas em neurônios pós-AVC pós-ischêmico (LINNIK; ZOBRIST; HATFIELD, 1993; MACMANUS *et al.*, 1993). Além disso, parece que a apoptose em neurônios da penumbra isquêmica pode ser recuperável (RADAK *et al.*, 2017).

Figura 2. Cascatas de sinalização apoptótica após isquemia cerebral.



A apoptose pode ser iniciada por eventos internos envolvendo a ruptura da mitocôndria e a liberação do CitC ou FIA, que executam a morte celular independente ou dependente de caspase, respectivamente. Alternativamente, os receptores da superfície celular podem ser ativados por ligantes específicos que se ligam aos “receptores da morte”. FIA, fator indutor de apoptose; CitC, citocromo C.

Fonte: Adaptado de Tuo; Zhang; Lei, 2022.

Desde a manutenção da homeostase iônica até a proliferação, várias atividades celulares requerem ATP (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009), e as células tornam-se inativas e subsequentemente degradam-se na sua ausência. Com a glicose como substrato metabólico primário, o ATP nas células de mamíferos é produzido principalmente de duas maneiras - a fosforilação oxidativa, que ocorre nas mitocôndrias, é a principal via para a produção de ATP (MOOKERJEE *et al.*, 2017), enquanto sob condições anaeróbicas, o ATP é produzido principalmente pela glicólise (ZHANG *et al.*, 2017).

Quando ocorre um AVC o transporte de oxigênio, glicose e outros substratos é severamente limitado. Consequentemente, os neurônios alteram suas rotas de suprimento de glicose, bem como a via do metabolismo da glicose, que transita da oxidação aeróbica para a oxidação anaeróbica - a glicose citosólica disponível é metabolizada pela oxidação anaeróbica e se torna a fonte primária de ATP (SCHEINBERG, 1979). No entanto, em comparação com a glicólise acoplada à fosforilação oxidativa, esse processo é consideravelmente menos eficiente: para 38 moléculas de ATP produzidas em condições aeróbicas, a degradação anaeróbica de uma molécula de glicose produz apenas duas moléculas de ATP (BONORA *et al.*, 2012). Portanto, o consumo supera rapidamente a produção e a concentração intracelular de ATP diminuem. Essa queda reduz os gradientes iônicos, ao mesmo tempo em que prejudica o influxo de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e o efluxo de K^+ (LENG *et al.*, 2014). Esses eventos celulares ativam ainda mais os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, causando a liberação de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular. Subsequentemente, o Ca^{2+} intracelular parece se acumular citotxicamente e desencadear apoptose intrínseca, bem como vários outros eventos citoplasmáticos e nucleares (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Durante a isquemia cerebral, o vazamento da BHE e as moléculas de sinalização (por exemplo, citocinas) liberadas pelos astrócitos, micróglia e oligodendrócitos podem causar inflamação (JIANG *et al.*, 2018). Embora muitos aspectos da inflamação se manifestem dias ou semanas após a isquemia, a cascata de inflamação é ativada imediatamente após o bloqueio de um vaso sanguíneo (IADECOLA; ANRATHER, 2011; DE MEYER *et al.*, 2016). Em modelos de AVC isquêmico em roedores, a ativação precoce da micróglia residente ativa a resposta inflamatória, causando um influxo maciço de macrófagos, neutrófilos polimorfos e linfócitos no parênquima cerebral (CHAMORRO *et al.*, 2012). Nos estágios iniciais de AVC isquêmico, o acúmulo de neutrófilos ocorre no núcleo isquêmico, enquanto a ativação e proliferação microglial ocorre na penumbra (MA *et al.*, 2017; WIMMER; ZRZAVY; LASSMANN, 2018). A ativação de células imunes durante a inflamação iniciada por

isquemia cerebral pode liberar vários fatores que desencadeiam a morte celular neuronal através da via apoptótica extrínseca (MARTIN-VILLALBA *et al.*, 1999), incluindo citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 β (IL-1 β) (SAMARY *et al.*, 2018), quimiocinas (GROSSE *et al.*, 2016), fatores de necrose tumoral (TNFs), como TNF- α/β , ligante Fas (FasL) e relacionados ao TNF receptor de ligante indutor de apoptose (TRAIL-R) (WU *et al.*, 2016).

A via de apoptose extrínseca é desencadeada pelos chamados “receptores de morte” da membrana plasmática. Os receptores conhecidos incluem TNF-receptor 1, antígeno-1 da apoptose (APO1/FAS/CD95) e TRAIL-R (BENN; WOOLF, 2004). A apoptose extrínseca pode ocorrer independentemente ou sinergicamente com a via mitocondrial. Durante um AVC isquêmico, um dos receptores mencionados anteriormente (APO1/FAS/CD95 ou TRAIL-R) se liga a um domínio de morte associado ao Fas (FADD) para criar um complexo de sinalização indutor de morte com a procaspase-8, que permite a ativação da caspase-8 (VELIER *et al.*, 1999; MUHAMMAD *et al.*, 2018). Uma vez que a caspase-8 é ativada há a ativação de caspases efetoras a jusante (como a caspase-3) por clivagem proteolítica direta (VELIER *et al.*, 1999; MORITA-FUJIMURA *et al.*, 2001) ou clivagem indireta de BID (domínio de interação Bcl-2) para tBID (forma ativa truncada do BID), que medeia a apoptose através da mitocôndria-via dependente (XU *et al.*, 2017). Plesnila *et al.* (2001) mostraram que os neurônios *knockout* BID são resistentes à morte após privação de oxigênio e glicose. *In vivo*, os volumes de infarto diminuíram e a liberação de CitC também foi menor em camundongos BID *knockout* após MCAo. Esses achados indicam que a liberação de CitC e a ativação de caspases podem ser importantes para a contribuição do BID na morte neuronal após isquemia cerebral. Yin *et al.* (2002) também descobriram que, embora a ativação de BID, bem como a liberação mitocondrial de CitC, possa ser facilmente detectada em cérebros de tipo selvagem após 3 h de isquemia cerebral focal, até 24 h depois, nenhuma liberação aparente de CitC foi detectada em cérebros deficientes em BID, o que destacou a importância do BID. Esta descoberta é apoiada pela descoberta de que a caspase-3, mas não a caspase-8, é desativada em cérebros deficientes em BID. Esses achados indicam que o BID é ativado pela caspase-8 no estágio inicial da isquemia neuronal; assim, pode ser um dos ativadores mais antigos e eficazes na via do apoptose mitocondrial (YIN *et al.*, 2002).

2.1.4 Tratamento

Atualmente, a única terapia aprovada no mundo para o tratamento do AVC isquêmico é o ativador de plasminogênio tecidual recombinante, legalizado pela *Food and Drug Administration* (FDA). No entanto, devido à estreita janela de tempo terapêutico de 4,5 h e ao risco potencial de transformação hemorrágica, apenas menos de 10% dos pacientes com AVC são elegíveis para tratamento com tPA (ZHANG *et al.*, 2022). Durante as últimas três décadas, um número crescente de investigações científicas básicas com foco na fisiopatologia e nos mecanismos do AVC concluiu que a neuroproteção é uma estratégia promissora para o tratamento dessa patologia (MINNERUP *et al.*, 2012; XIONG; LIU; YAN, 2018).

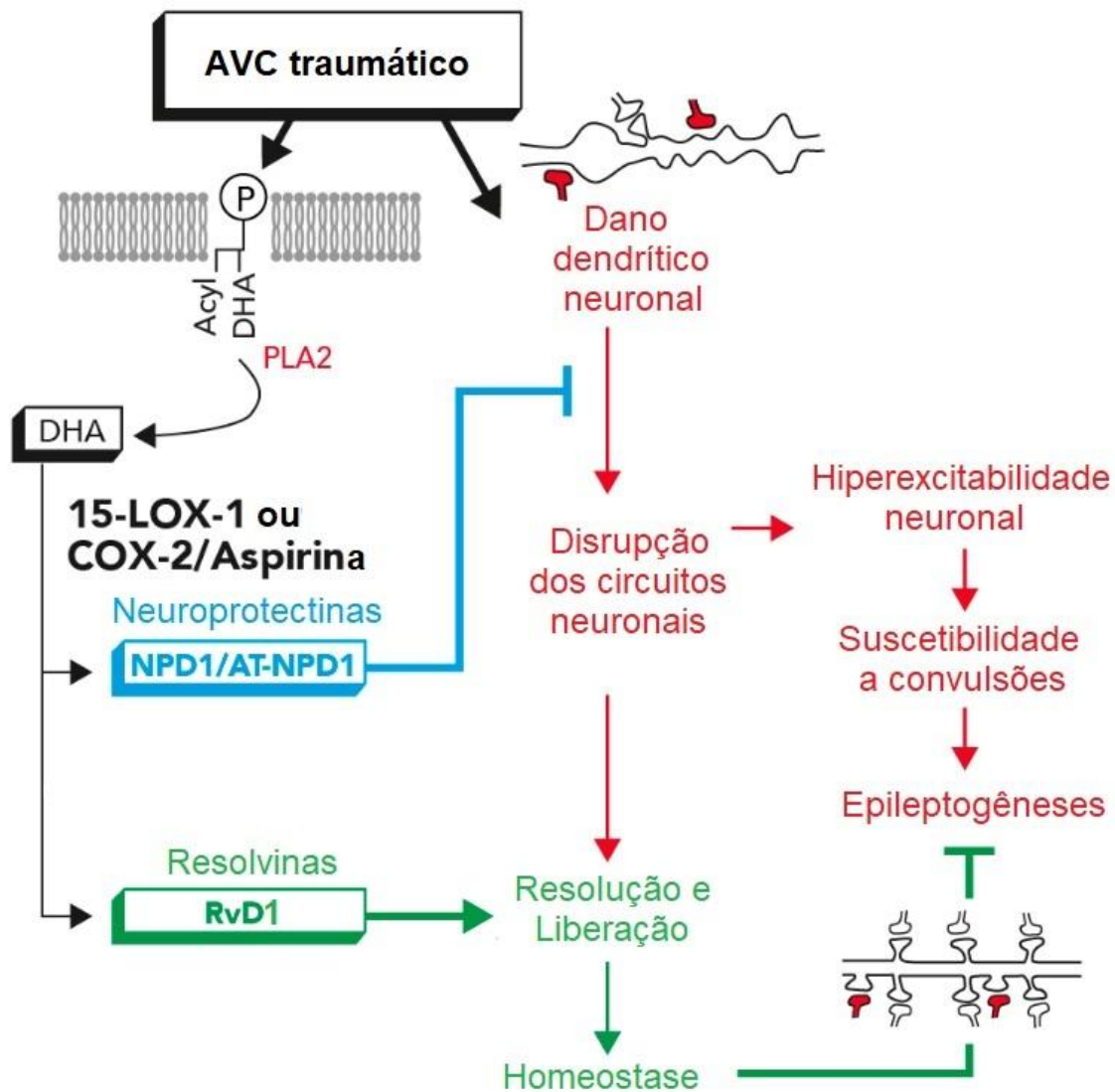
O objetivo terapêutico final para AVC isquêmico e infartos cerebrais é reduzir as lesões neuronais aliviando a oclusão arterial (recanalização) e recuperando o fluxo sanguíneo cerebral (reperusão). A hipótese básica da resposta fisiopatológica durante o tratamento é que, uma vez que a artéria cerebral foi ocluída, os tecidos cerebrais hipoperfundidos correm risco de infarto permanente, mas esses tecidos podem ser efetivamente resgatados por meio da rápida recuperação do fluxo sanguíneo. Esses tecidos são conhecidos como penumbras isquêmicas, e prevenir a conversão da penumbra isquêmica em infarto irreversível é o objetivo do tratamento. Os desafios do tratamento do AVC primário são, em parte, resultado da distinção entre a penumbra e a zona central e a penumbra dos tecidos de hipoperfusão benigna, que têm perfusão ruim, mas sem risco de infarto (ZHAO *et al.* 2022).

A maioria dos medicamentos naturais exerce efeitos antioxidantes regulando o estresse oxidativo relacionado vias de sinalização. O AVC agudo é seguido por neuroinflamação secundária que leva à morte celular. Os sinais pró-inflamatórios secretados pelas células imunes ativam células residentes e atraem células inflamatórias periféricas, que se infiltram na área da lesão (JAYARAJ *et al.*, 2019). Estudos recentes identificaram a neuroinflamação como um determinante chave do prognóstico do AVC e demonstraram que a inibição das respostas inflamatórias após o AVC agudo pode prevenir lesões cerebrais e, portanto, melhorar o resultado neurológico a longo prazo (FANG *et al.*, 2019). Alguns compostos naturais extraídos de formulações medicinais naturais parecem ter um alto potencial para proteger o cérebro da lesão de reperusão isquêmica, reduzindo a neuroinflamação durante o estágio agudo do AVC (WIDMANN *et al.*, 2018). Além disso, imediatamente após o AVC isquêmico, a ativação da micróglia as transforma em células altamente plásticas que são polarizadas no fenótipo de ativação clássico (M1) ou alternativo (M2) (HU *et al.*, 2012). Existe um consenso emergente de que promover a polarização da micróglia para o fenótipo

M2 pode fornecer neuroproteção no AVC. Curiosamente, estudos recentes também mostraram que alguns medicamentos naturais têm efeitos neuroprotetores no AVC ao regular a polarização da micróglia (JIANG *et al.*, 2020).

Apesar de exibir eficácia em estudos experimentais de AVC, a neuroproteção falhou em ensaios clínicos. As dificuldades translacionais incluem um acordo metodológico limitado entre estudos pré-clínicos e clínicos e a heterogeneidade do AVC em humanos em comparação com AVCs padronizados em modelos animais. Abordagens neuroprotetoras promissoras baseadas em uma compreensão mais profunda da complexa fisiopatologia do AVC isquêmico, como o bloqueio de vias pró-inflamatórias e mediadores pró-sobrevivência, agora são avaliadas em estudos pré-clínicos. A terapia combinada tornou-se cada vez mais atraente nos últimos anos, à medida que o reconhecimento da complexidade da progressão do AVC se torna evidente. Trabalhos recentes testaram a hipótese de que o bloqueio do receptor do fator ativador de plaquetas pró-inflamatório (PAF-R) com LAU-0901 mais a administração de um docosanoide selecionado, AT-NPD1, ativa as vias de sobrevivência celular após a MCAo e isso levaria à recuperação neurológica. Também foi demonstrado que o tratamento com LAU-0901 mais AT-NPD1 proporciona neuroproteção de alto grau em MCAo, igualando ou excedendo o proporcionado por LAU-0901 ou AT-NPD1 sozinho em doses consideravelmente moderadas, e tem uma ampla janela terapêutica que se estende até 6 horas após o início do AVC (BELAYEV; REID; BAZAN, 2023). E há as resolvinas, que são derivadas de DHA ou EPA e, após sua liberação da membrana celular, as enzimas LOXs e citocromo-P450 convertem DHA em resolvinas da série D (RvD1–RvD6) (VIDELA *et al.*, 2019; OSTERMANN *et al.*, 2019). As resolvinas da série D derivadas do DHA também reduzem a inflamação em lesões renais e distúrbios cardiovasculares e autoimunes (SERHAN, 2017). Até agora, RvD1 e RvD2 foram estudados em relação ao AVC (BISICCHIA *et al.*, 2018). Ambos têm estruturas semelhantes, mas receptores distintos, ou seja, RvD1 exerce suas ações através de FPR2 ou GPR32, enquanto GPR18 medeia a atividade de RvD2 (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2010). RvD1 IP administrado melhorou a recuperação funcional e protegeu ratos com lesões por hemicerebelectomia contra morte celular neuronal remota e neuroinfamação (BISICCHIA *et al.*, 2018). A Figura 3 sumariza a produção e ação dessas substâncias.

Figura 3. O papel do DHA e seus derivados na homeostase.



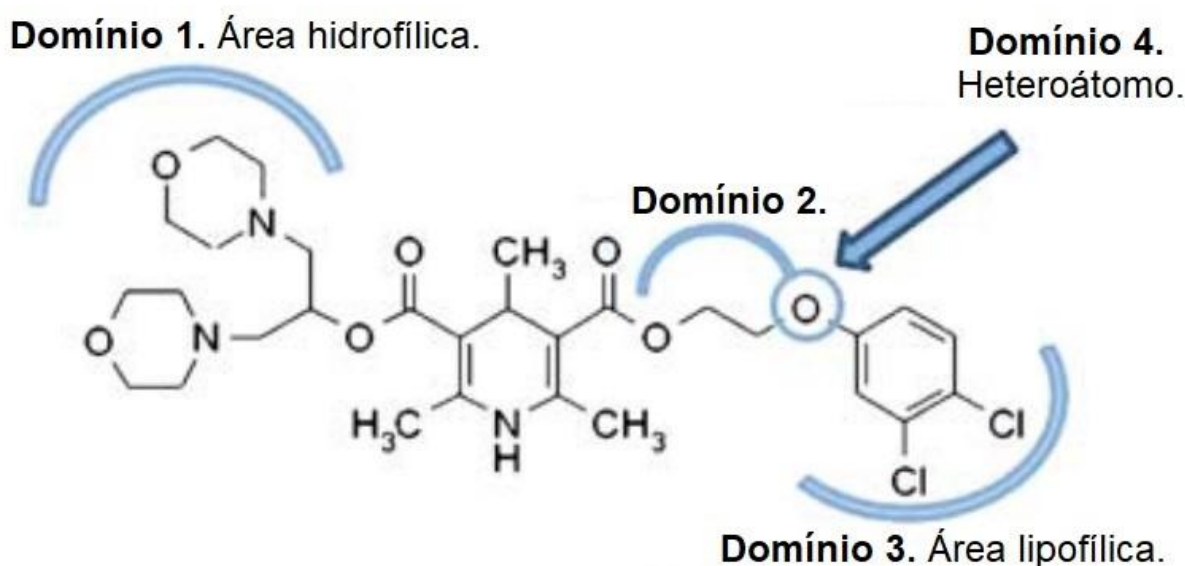
Fonte: Adaptado de Bazan, 2016. Disponível em: <<https://researchfeatures.com/marvellous-mind/>>. Acesso em 12/07/2023.

O PAF é um potente mediador fosfolipídico de curta duração das funções leucocitárias, agregação plaquetária e sinalização pró-inflamatória. Ele se acumula no cérebro após isquemia cerebral e, em conjunto com a liberação inespecífica de glutamato e inibição da recaptação de glutamato, leva à sobrecarga intracelular de Ca^{2+} , disfunção mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio e excitotoxicidade mediada por inflamação (BAZAN, 2005a).

LAU-0901 é um antagonista de PAF altamente potente e seletivo (**Figura 4**) que inibe a apoptose, reprime a quimiotaxia de células inflamatórias, protege os fotorreceptores do estresse oxidativo induzido pela luz e inibe as respostas inflamatórias nas células retinianas,

corneanas e neurais (BAZAN *et al.*, 2003; CORTINA *et al.*, 2005; HE; BAZAN, 2006; BOETKJAER *et al.*, 2007). Foi demonstrado que o tratamento com LAU-0901 mais AT-NPD1 proporciona neuroproteção de alto grau em MCAo, igualando ou excedendo o proporcionado por LAU-0901 ou AT-NPD1 sozinho em doses consideravelmente moderadas, e tem uma ampla janela terapêutica que se estende até 6 horas após o início do AVC (**Figura 5**). Os mecanismos exatos de LAU-0901 mais AT-NPD1 permanecem obscuros. Mas, pode-se especular que a inibição articular e a resolução da inflamação por LAU-0901 e AT-NPD1 fornecem neuroproteção aditiva em AVC experimental.

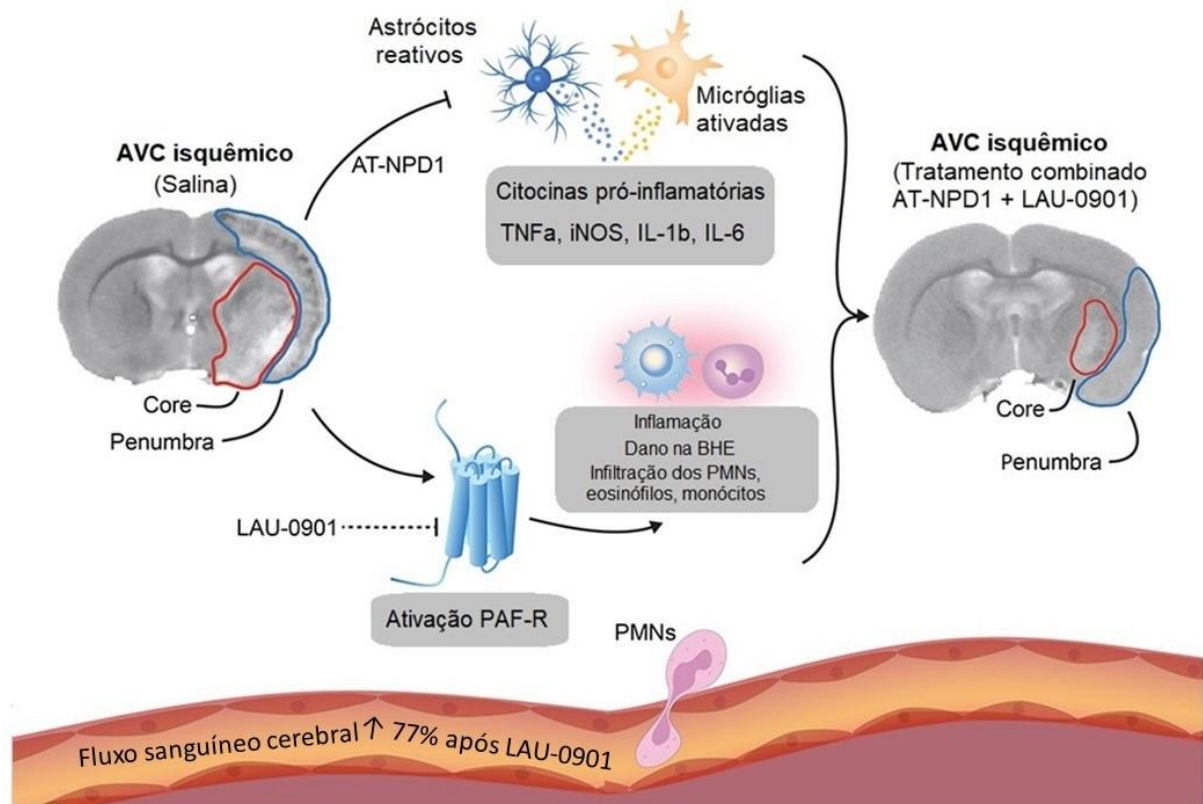
Figura 4. Estrutura química de LAU-0901.



Nicolas G. Bazan, Carlos Sunkel, Victor Marcheselli e Julio Alvarez-Builla Gomez. “Ésteres de ácido 2,4,6-trimetil-1,4-di-hidro-piridina-3,5-dicarboxílico como drogas neuroprotetoras.” Estados Unidos. Patente de nº 6.566.359.

Fonte: Adaptado de Belayev *et al.*, 2012.

Figura 5. Inibição da sinalização inflamatória e ativação de PAF-R induzida por lesão de I/R por LAU-0901 e AT-NPD1.



A lesão de I/R desencadeia a ativação da microglia e dos astrócitos, causando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , iNOS, IL-1 β , IL-6). A ativação do PAF-R está associada ao aumento da inflamação, dano à BHE e infiltração de PMNs, eosinófilos e monócitos. O tratamento com LAU-0901 mais AT-NPD1 reduziu os volumes de penumbra e lesão central após MCAo.

AT-NPD1 = neuroprotectina D1 desencadeada por aspirina, BBB = barreira hematoencefálica, IL-1 β = interleucina 1 beta, IL-6 = interleucina 6, iNOS = óxido nítrico sintase induzível, PAF-R = receptor do fator ativador de plaquetas, PMNs = neutrófilos polimorfonucleares, TNF α = Fator de necrose tumoral alfa.

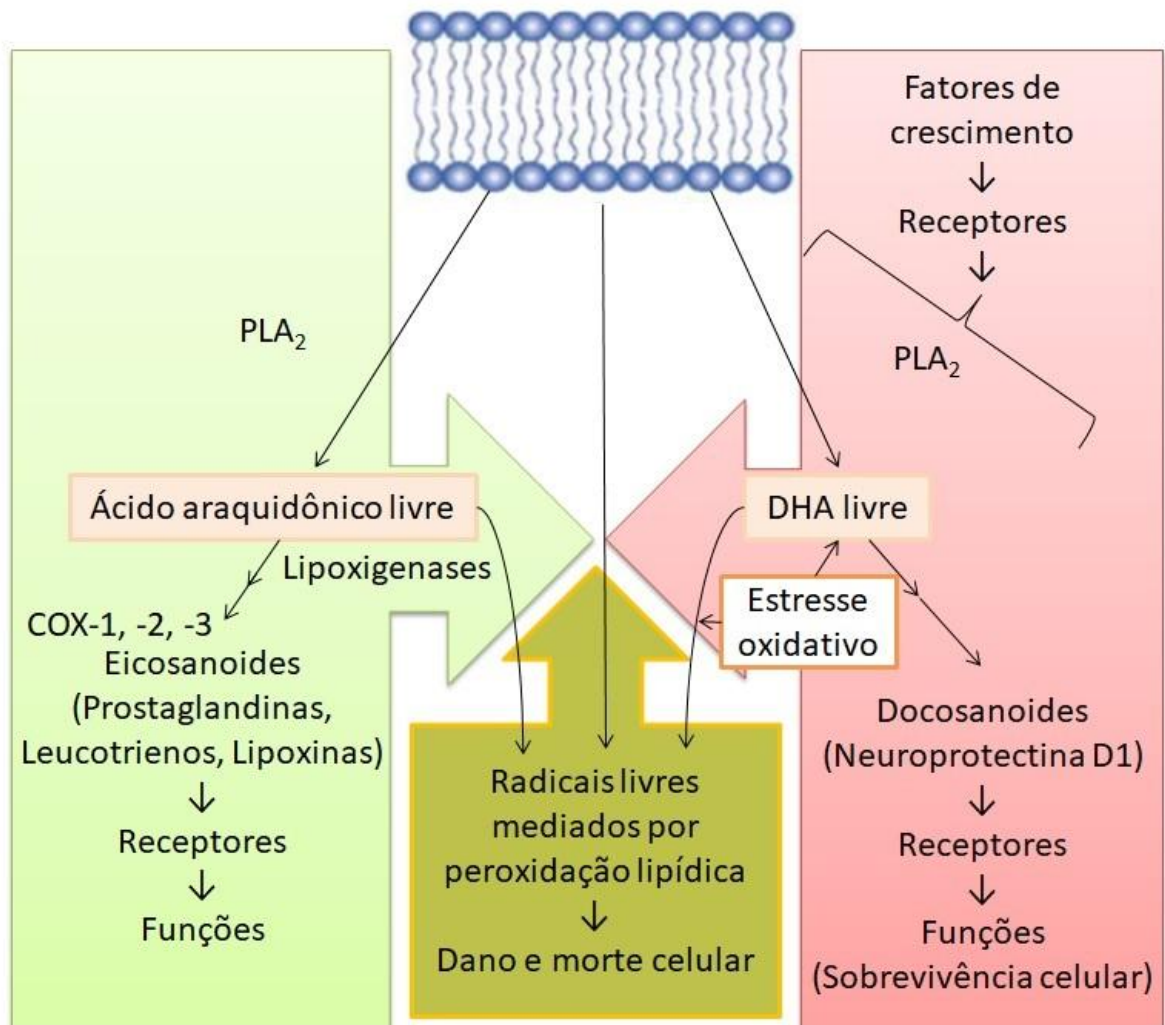
Fonte: Adaptado de Belayev; Reid; Bazan, 2023.

O NPD1 é formado através de etapas mediadas por enzimas catalisadas por uma fosfolipase A2 seguida por uma atividade semelhante à 15-lipoxigenase (**Figura 6**). Sabe-se que a retina é capaz de gerar derivados mono, di e trihidroxi do DHA, e que os inibidores da lipoxigenase bloqueiam essa síntese, sugerindo um processo enzimático envolvendo uma lipoxigenase (BAZAN; BIRKLE; REDDY, 1984)). Então foi sugerido que os docosanoides podem ser dotados de bioatividade neuroprotetora (BAZAN, 1990). No cérebro e na retina, a disponibilidade de DHA livre (não esterificado) é rigidamente controlada. A regulação da fosfolipase A2 que libera DHA livre desempenha um papel importante na via que leva à formação de NPD1. A importância desta etapa é destacada pela ativação muito rápida da

liberação de DHA livre no cérebro como uma resposta inicial à estimulação, isquemia ou convulsões (BAZAN, 2003; SUN *et al.*, 2004).

O ácido araquidônico (AA) nos fosfolipídios é o reservatório de eicosanoides biologicamente ativos. Foi demonstrado que o DHA em fosfolipídios também é um reservatório para mediadores biologicamente ativos, os docosanoides. Ambos os ácidos graxos poliinsaturados também são um alvo para a peroxidação mediada por radicais livres (**Figura 6**). AA e DHA grátis são liberados dos fosfolipídios da membrana através da ação de fosfolipases em resposta à estimulação (neurotransmissores, convulsões breves), isquemia, neurotrauma (SUN *et al.*, 2004). Essa resposta nos diz que as fosfolipases são um importante guardião regulador na iniciação das vias dos eicosanoides e docosanoides, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Durante a função das células basais, há uma reacilação ativa dependente de ATP de AA e DHA livres nos fosfolipídios da membrana. O estresse oxidativo no cérebro gera neuroprostanos a partir do DHA, por meio de uma reação independente de enzima (ROBERTS *et al.*, 1998). O DHA é claramente necessário para o desenvolvimento do cérebro e da retina (DE AVELDAÑO CALDIRONI; BAZAN, 1977) e tem sido implicado em várias funções, incluindo as de membranas excitáveis (LITMAN *et al.*, 2001), memória (MORIGUCHI; SALEM, 2003), biogênese e função de fotorreceptores (ANDERSON *et al.*, 2002; BICKNELL *et al.*, 2002) e neuroproteção (KIM *et al.*, 2000). Uma propriedade da retina e do cérebro (no que diz respeito aos ácidos graxos ômega-3) é sua capacidade incomum de retenção de DHA, mesmo durante a privação alimentar prolongada de ácidos graxos essenciais da família ômega-3. Para reduzir efetivamente o conteúdo de DHA na retina e no cérebro em roedores e em primatas não humanos foi necessária a privação alimentar por mais de uma geração (WEISINGER *et al.*, 2002), o que produz deficiências na função retiniana (WHEELER; BENOLKEN; ANDERSON, 1975; NEURINGER *et al.*, 1984).

Figura 6. Destino das cadeias acílicas poliinsaturadas de fosfolipídios de membrana.



As setas centrais indicam que a peroxidação lipídica mediada por radicais livres pode atacar cadeias araquidonoíla ou docosahexaenóica esterificadas, bem como ácidos araquidônicos livres ou docosahexaenóico (setas à esquerda e à direita). Os produtos da peroxidação lipídica em evolução são altamente reativos e promovem mais lesão celular. À esquerda do diagrama, a fosfolipase A2 é representada liberando ácido araquidônico livre e levando à cascata de eicosanoides que modula as funções celulares por meio de receptores específicos. No lado direito do diagrama, sugere-se que a ativação mediada por fatores de crescimento da síntese de docosanoides leva a mediadores biologicamente ativos, como a neuroprotectina D1, que por sua vez opera por meio de receptores. O estresse oxidativo por si só ativa a síntese de docosanoides (para neutralizar as ações citotóxicas) e a peroxidação lipídica mediada por radicais livres. PLA₂ = fosfolipase A₂.

Fonte: Adaptado de Bazan, 2005b.

AT-NPD1 exibe bioações protetoras potentes comparáveis a NPD1 *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a infiltração de PMN e aumentando a remoção de PMN apoptóticos por macrófagos e, portanto, sinaliza os sinais cardeais de resolução (SERHAN *et al.*, 2015). A aspirina é única em seu modo de ação e, ao contrário de muitos dos anti-inflamatórios atuais

que atrasam a resolução completa e são considerados tóxicos para este processo vital (ou seja, resolução tóxica) (SCHWAB *et al.*, 2007), a aspirina inicia a resolução por novos mecanismos não reconhecidos anteriormente que envolvem a biossíntese da aspirina desencadeada (AT) por mediadores lipídicos (SERHAN, 2007). A aspirina é bem apreciada por sua capacidade de inibir a COX-1 e inativar essa enzima, bloqueando a produção de prostaglandina e tromboxano em células que possuem essas vias biossintéticas. O mecanismo de ação da aspirina envolve a acetilação da COX dentro da região catalítica da enzima. Isso evita o alinhamento do substrato ácido araquidônico para oxigenação dentro do centro catalítico que produz o intermediário endoperoxídeo de prostaglandina (PGG2) necessário para a biossíntese de tromboxanos e prostaglandinas via COX-1 (SAMUELSSON, 1982). AT-NPD1 foi identificado na resolução de exsudatos murinos tratados com aspirina. Assim, o AT-NPD1 biológico foi obtido a partir da resolução de exsudatos murinos *in vivo*. AT-NPD1 também foi isolado e identificado a partir de leucócitos humanos ativados, ou seja, PMN humano tratado com aspirina (SERHAN *et al.*, 2002).

Mediadores lipídicos pró-resolução derivados do ácido eicosapentaenóico (EPA) e DHA foram identificados (MARCHESELLI *et al.*; 2003; SERHAN *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2004; SPITE; SERHAN, 2010), incluindo NPD1 e resolvinas da série D1 (RvD1), que exibem potentes propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras (ASATRYAN; BAZAN, 2017). Eles antagonizam a sinalização pró-inflamatória na infiltração de macrófagos/neutrófilos, aumentam a fagocitose de macrófagos em direção a células apoptóticas e aceleram o reparo tecidual (CHENG; RONG, 2019). A ação neuroprotetora de NPD1 na isquemia cerebral focal (MARCHESELLI *et al.*, 2003; BELAYEV *et al.*, 2018) promove a sobrevivência celular e inibe a infiltração de leucócitos mediada por I/R (RODRIGUEZ DE TURCO *et al.*, 2002; MARCHESELLI *et al.*, 2003).

As resolvinas da série D são mediadores lipídicos endógenos derivadas do DHA também reduzem a inflamação em lesões renais e distúrbios cardiovasculares e autoimunes (SERHAN, 2017). Até agora, RvD1 e RvD2 foram estudados em relação ao AVC (BISICCHIA *et al.*, 2018). Ambos têm estruturas semelhantes, mas receptores distintos (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2010). RvD1 administrado via intraperitoneal (IP) melhorou a recuperação funcional e protegeu ratos com lesões cerebrais contra morte celular neuronal remota e neuroinflamação (BISICCHIA *et al.*, 2018). Juntos, NPD1 e RvD1 possuem efeitos anti-inflamatórios potentes que podem mitigar os resultados adversos após o AVC. A RvD1 demonstrou exercer efeitos anti-inflamatórios em vários modelos de doenças, incluindo peritonite, hemangiogênese inflamatória da córnea e lesão pulmonar induzida por isquemia-

reperusão (WANG *et al.*, 2011b). RvD1 limita a infiltração de neutrófilos durante a fase diminuída da inflamação, regula a migração de células endoteliais leucocitárias polimorfonucleares humanas (SUN *et al.*, 2007), inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias (DUFFIELD *et al.*, 2006) e aumenta a função fagocítica e a apoptose celular (DALLI; SERHAN, 2012). Durante a lesão pulmonar aguda, os macrófagos são divididos em macrófagos residentes e macrófagos recrutadores (GORDON; TAYLOR, 2005). Os macrófagos residentes têm um certo grau de automanutenção em um estado estável (HASHIMOTO *et al.*, 2013) e são os principais coordenadores da inflamação e reparo nos pulmões (JOHNSTON *et al.*, 2012). O recrutamento de macrófagos decorre de monócitos circulantes no sangue. A proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 promove o recrutamento de monócitos para tecidos inflamatórios para desempenhar suas funções (AMANO *et al.*, 2004). Esses dois tipos de células desempenham funções diferentes na lesão pulmonar aguda. Estudos mostram que a depleção e o recrutamento de macrófagos podem reduzir a inflamação pulmonar alérgica aguda (ZASŁONA *et al.*, 2014). A eliminação de macrófagos de locais de lesão crônica resulta no alívio rápido da inflamação (DUFFIELD *et al.*, 2005). Além disso, os macrófagos recrutados sofrem apoptose durante a inflamação (JANSSEN *et al.*, 2011) e são posteriormente eliminados pelos fagócitos vizinhos, o que também constitui uma etapa necessária na resolução da inflamação pulmonar aguda (KEARNS *et al.*, 2014).

2.1.5 Manejo clínico do AVC

Atualmente, a terapia trombolítica é o tratamento mais amplamente aplicado para AVC isquêmico e infarto cerebral. O princípio básico da trombólise é recanalizar e reperfundir as artérias cerebrais usando drogas trombolíticas e dispositivos mecânicos de trombectomia, eventualmente levando à recuperação parcial dos tecidos cerebrais e das funções neurais. A eficácia clínica da terapia trombolítica intravenosa foi estabelecida para pacientes dentro de 4,5 horas após o início do AVC. No entanto, numerosos pacientes vivenciam situações complicadas, como oclusão da artéria proximal, início do AVC > 4,5 horas e contraindicação de trombólise sistêmica devido a grandes cirurgias recentes ou hemorragia ativa. Esses pacientes não são adequados para terapia de trombólise intravenosa. Portanto, uma revisão recente indicou que vários estudos e ensaios clínicos se concentraram em tratamentos baseados em cateteres ou artérias que removem diretamente as oclusões nos vasos sanguíneos e recuperam o fluxo sanguíneo (ZHAO *et al.*, 2022).

Ensaio clínico financiado pelo Instituto Nacional de Doenças Neurológicas e Derrame dos Estados Unidos e pelo *European Acute Stroke Study* mostraram que a trombólise intravenosa tem fortes efeitos em pacientes com sintomas leves de AVC ou sem incapacidade, e que a trombólise intravenosa tem mais benefícios do que limitações em pacientes com uma gama completa de deficiências. Por exemplo, o tratamento com ativador do plasminogênio tecidual na janela de 3 a 4,5 h confere benefício em aproximadamente metade dos pacientes do que o tratamento por <3 h, sem aumento na atribuição de danos; ~ 1 em 6 pacientes tem um resultado melhor e 1 em 35 tem um resultado pior como resultado de terapia. Estudos anteriores estabeleceram a trombólise intravenosa como a terapia padrão para pacientes com AVC isquêmico arterial dentro de 3 horas após o início do AVC. A trombólise intravenosa é benéfica para todos os níveis e subtipos de AVC, e 35-40% dos pacientes apresentaram um bom resultado terapêutico. No entanto, apenas 10-15% das oclusões da artéria carótida interna e 25-50% da MCAo proximal foram aliviadas apenas pela terapia de trombólise intravenosa. Esses dados indicaram que a oclusão da artéria proximal (artéria carótida interna e MCAo) pode ser resistente apenas à terapia de trombólise intravenosa. A oclusão da artéria proximal leva a um terço dos casos de AVC isquêmico agudo com sintomas graves de AVC e tem como resultado negativo a reperfusão ineficaz. Assim, vários ensaios clínicos de larga escala têm focado na identificação de outras terapias substitutivas ou adjuvantes baseadas na trombólise intravenosa para melhorar a recanalização e a taxa de reperfusão (ZHAO *et al.*, 2022).

A trombólise arterial consiste em trombólise química e trombectomia mecânica, e o uso de terapia intravenosa antes da trombectomia mecânica tem sido questionado recentemente. A eficácia clínica e a segurança da trombólise arterial com o trombolítico seletivo pró-uroquina recombinante (r-proUK) foram investigadas em dois ensaios clínicos randomizados de tratamento de AVC agudo, a saber, Ensaio Clínico Prospectivo Randomizado de Anticoagulação na Válvula X (PROACT I e II). Foi demonstrado que pacientes tratados com tal terapia apresentam risco de hemorragia cerebral. Além disso, o resultado da combinação de trombólise arterial com outros agentes como terapia permanece obscuro. Portanto, o FDA não concedeu a aplicação clínica do r-proUK arterial. No entanto, um estudo recente relatou que o r-proUK promoveu trombólise e recanalização, com diminuição do risco de hemorragia cerebral e, portanto, esse tratamento exerceu efeitos protetores sobre a isquemia cerebral em coelhos. Diferente da trombólise química desenvolvida recentemente, a trombectomia mecânica tem sido amplamente aplicada na clínica. A FDA concedeu permissão para vários dispositivos de trombectomia mecânica com

base em resultados positivos gerados por numerosos ensaios clínicos em larga escala. Esses dispositivos podem efetivamente recanalizar a oclusão da artéria proximal com uma taxa aceitável de complicações. De fato, qualquer tipo de hemorragia intracerebral foi observado com menos frequência no grupo de trombectomia mecânica isolada em comparação com o grupo que usou a combinação de trombólise intravenosa com trombectomia mecânica. No entanto, o grupo de trombectomia mecânica sozinho falhou em mostrar um resultado funcional favorável entre os pacientes com AVC por oclusão aguda de grandes vasos em comparação com o grupo combinado. Além disso, um achado recente apoiou a hipótese de que a terapia intravenosa antes da trombectomia mecânica não influencia o prognóstico de pacientes com AVC (ZHAO *et al.*, 2022).

Ensaio de novos métodos de recanalização com base na seleção de ferramentas de ressonância magnética de pacientes estão em andamento. A menos que um local de lesão específico seja levado em consideração, é difícil prever déficits funcionais devido a infartos de tamanho médio. Informações precisas sobre a localização da lesão e a progressão da doença são cruciais para a terapia clínica. Portanto, compostos neuroprotetores promissores na fase pré-clínica podem ser posteriormente descartados por ineficácia em ensaios clínicos de larga escala devido a informações imprecisas. O infarto da cápsula interna pode estar associado a comprometimento motor e mau prognóstico em pacientes com AVC. Informações pré-clínicas de ressonância magnética (RM) sobre o tamanho do volume e a localização precisa da lesão no IC são necessárias para a terapia subsequente. Além disso, o estado do dano neurológico de acordo com a ressonância magnética, bem como a destruição de estruturas axonais e alterações patológicas de acordo com a imunocoloração, fornecem informações para o local preciso da injeção de drogas neuroprotetoras. Assim, a ressonância magnética combinada e os métodos histológicos fornecem um método poderoso de avaliação do dano neuronal durante a terapia de isquemia cerebral (ZHAO *et al.*, 2022).

3 JUSTIFICATIVA

O AVC isquêmico é uma das principais causas de morte e a principal causa de incapacidade permanente. As opções terapêuticas atuais são limitadas e não abordam a resposta imune associada e a inflamação aguda que ocorre no local da isquemia cerebral. A lesão de I/R está associada à desregulação de múltiplas vias neuroinflamatórias (BELAYEV *et al.*, 2020) e à interrupção dos circuitos neuronais, o que, por sua vez, resulta em muitas das patologias que afetam os sobreviventes de AVC (BAZAN, 2007).

Uma supressão robusta da sinalização pró-inflamatória foi alcançada pelo uso de LAU-0901, uma pequena molécula antagonista do sistema plaquetário do PAF-R (BAZAN, 2005a). O LAU-0901 melhorou os déficits comportamentais, reduziu os volumes de infarto quando administrado 2 h após a MCAo (BELAYEV *et al.*, 2008; BELAYEV *et al.*, 2012) e conferiu neuroproteção duradoura em animais que sobreviveram por várias semanas após o AVC (BELAYEV *et al.*, 2009). Efeitos neuroprotetores e aceleração da resolução inflamatória foram alcançados pela administração de docosanoides bioativos, mediadores lipídicos endógenos derivados do DHA, um dos principais ácidos graxos ômega-3 no cérebro após I/R cerebral. A NPD1 e a AT-NPD1 são docosanoides sintéticos previamente estudados e descobriu-se que eles promovem a sobrevivência de células neuronais com importante atividade antiinflamatória (BAZAN, 2009; SERHAN *et al.*, 2011; BAZAN *et al.*, 2012). Além disso, RvD1 é um mediador lipídico anti-inflamatório endógeno envolvido em doenças neurodegenerativas, bem como na aterosclerose (MIAO *et al.*, 2021).

Esse estudo visa introduzir uma nova abordagem para direcionar farmacologicamente e resolver disrupções neuroinflamatórias para atingir a integridade da rede neuronal sustentada e a recuperação neurológica. Para abordar os componentes patogênicos multifacetados do AVC, foi proposta uma terapia combinada para bloquear eventos pró-inflamatórios ao mesmo tempo em que promove a neuroproteção e a resolução da inflamação.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Explorar se o bloqueio do receptor pró-inflamatório do PAF-R mais docosanoides selecionados ou esses docosanoides isolados levariam à recuperação neurológica após a MCAo.

4.2 Específicos

- Investigar se as seguintes moléculas ativam as vias de sobrevivência celular e exercem atividade anti-inflamatória no cérebro: LAU-0901, um antagonista do PAF-R que bloqueia a sinalização pró-inflamatória; e derivados do DHA, NPD1 e AT-NPD1.
- Investigar a dose-resposta e a janela terapêutica do LAU-0901, NPD1, AT-NPD1 e RvD1.
- Avaliar se NPD1, RvD1 e sua combinação exercem neuroproteção quando administrados sistemicamente em até 6 h após isquemia cerebral focal em ratos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e aspectos éticos

Ratos machos Sprague-Dawley (280–370 g; 8-10 semanas de idade) obtidos do *Charles River Laboratories* (Wilmington, MA, EUA) foram usados em todos os estudos. Os animais foram mantidos no biotério da *Louisiana State University Health New Orleans* 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 procedimentos com animais cumpriram as diretrizes descritas no Guia para o Cuidado e Uso de Animais Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (USA, 2011) e foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais (IACUC) da *Louisiana State University Health Science Center* (LSUHSC, Louisiana, Nova Orleans, Estados Unidos), sob o número de protocolo 3778. Esforços máximos foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais.

5.2 Modelo experimental

5.2.1 Anestesia e preparação cirúrgica

A anestesia foi induzida com 3% de isoflurano em uma mistura de 70% de óxido nitroso e 30% de oxigênio, mantida com isofurano 1% na mesma mistura de gases durante o procedimento. Todos os animais foram imobilizados com brometo de pancurônio (0,6 mg/kg, IV; Pavulon®), intubados orotraquealmente e ventilados mecanicamente. Os cateteres foram implantados na artéria e veia femoral direita para mensuração da pressão arterial, coleta de sangue e infusão de drogas (**Figura 7**). Antes, durante e após o procedimento foram realizadas análises seriadas de parâmetros fisiológicos, como gasometria arterial, glicemia, hematócrito, pressão arterial e frequência cardíaca.

A PCO₂ foi mantida entre 36-40 mmHg e a PO₂ entre 105-120 mmHg, ajustada por meio de um ventilador. A temperatura retal (CMA/150 Temperature Controller, CMA/Microdialysis AB, Estocolmo, Suécia) foi monitorada de perto e mantida com uma lâmpada de aquecimento e placa a 36-37,5 °C durante e após a MCAo. A temperatura craniana foi medida por uma microsonda de agulha sob o músculo temporal músculo

temporal (Omega Engineering, Stamford, CT) e regulada entre 36,2-37 °C. Os ratos foram alojados 1 por gaiola após a cirurgia. A temperatura retal e o peso corporal foram monitorados diariamente durante o período de sobrevivência.

Figura 7. Preparação para o procedimento cirúrgico de oclusão da artéria cerebral média (MCAo) em ratos.



(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.

Fonte: Adaptado de Belayev; Endres; Prinz, 2010 e Freitas, 2018.

5.2.2 Preparo do fio de sutura para oclusão da artéria cerebral média

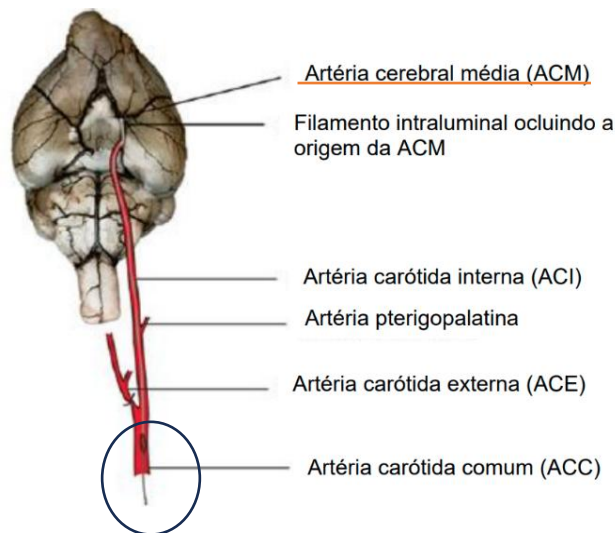
Um fio de sutura de nylon monofilamentar 3-0 (Harvard Apparatus®, South Natick, MA) foi dividido em segmentos medindo 4 cm de comprimento e tiveram uma de suas extremidades distais arredondadas por meio de aquecimento próximo uma chama e então revestidos com solução de poli-L-lisina (0,1% (p/v), em água 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).

5.2.3 Modelo de isquemia *in vivo*: Oclusão transitória da artéria cerebral média (MCAo)

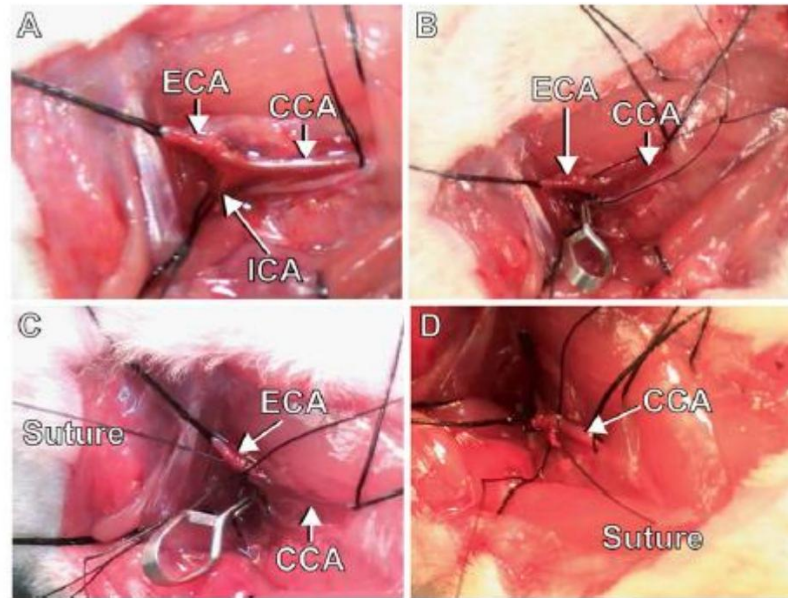
Ratos foram submetidos a 2 h de MCAo direito por um filamento intraluminal, conforme descrito anteriormente (BELAYEV, 1996). Uma incisão na linha média no pescoço expôs a artéria carótida comum direita (CCA), dissecada para libertá-la dos nervos e fâscia circundantes. Um monofilamento de náilon 3-0 revestido com poli-L-lisina foi avançado através da artéria carótida externa até a MCA até que uma leve resistência fosse sentida (**Figuras 8 e 9**). A anestesia foi retirada e após 60 min de MCAo os animais foram testados em uma bateria neurocomportamental padronizada para confirmar a presença de um déficit neurológico de alto grau (BELAYEV, 1996). Após 2 h de MCAo, os ratos foram reanestesiados com a mesma combinação anestésica. As sondas de temperatura foram reinseridas, as suturas intraluminais foram cuidadosamente removidas e os animais foram deixados sobreviver por 1, 3, 7 ou 14 dias, de acordo com o desenho experimental, com livre acesso a comida e água.

Figura 8. Oclusão da artéria cerebral média (MCAo) por filamento intraluminal.



Fonte: Adaptado de Belayev; Endres; Prinz, 2010; Freitas, 2018.

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



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.

Fonte: Adaptado de Belayev; Endres; Prinz, 2010; Freitas, 2018.

5.3 Testes neurocomportamentais

Todos os animais foram avaliados por uma bateria de testes neurocomportamentais padronizada por 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 comportamentais.

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

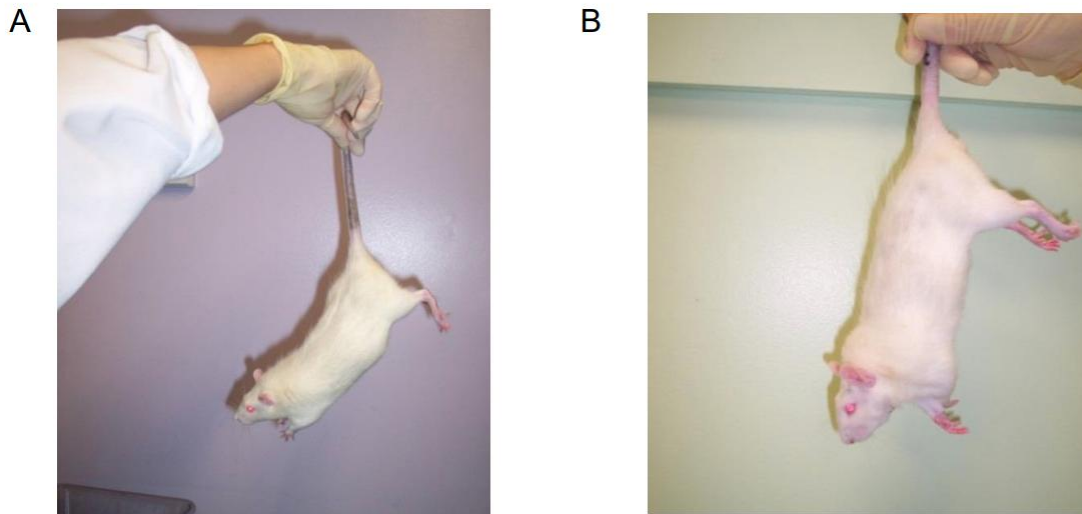
Escores*: 0 = Ausência de déficit observável; 1 = Discreta resposta de flexão de membro mediante suspensão da cauda; 2 = Ausência total de resposta, déficit consistente visível.

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.

Fonte: Adaptado de Belayev et al., 1996.

O teste de avaliação neurocomportamental do reflexo postural 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. Os escores atribuídos nesse teste variaram de 0 a 2: 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 10**).

Figura 10. Avaliação neurocomportamental do reflexo postural.

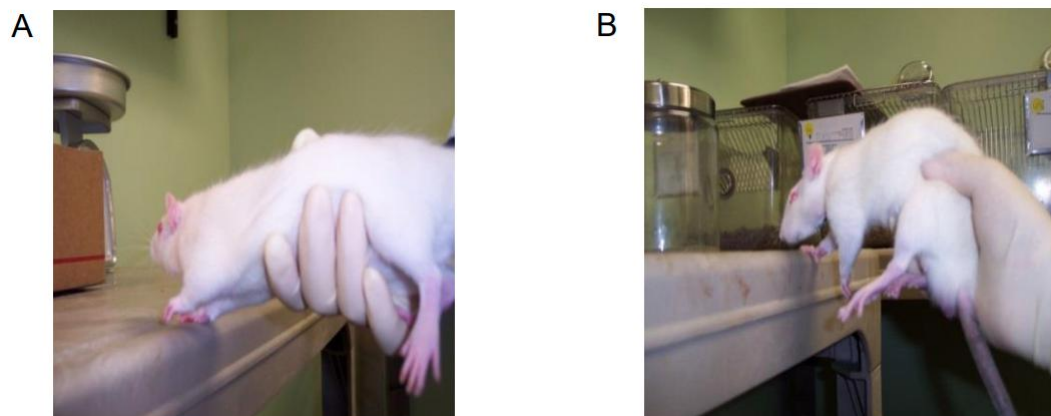


(A) reflexo postural normal antes da MCAo; (B) reflexo postural após MCAo.

Fonte: Adaptado de Freitas, 2018.

O teste de resposta de membros anteriores induzidos foi utilizado para avaliar a integração sensório-motora, avaliando as respostas dos membros anteriores frente a estímulos visuais, táteis e proprioceptivos. Os escores atribuídos nesse teste variam de 0 a 2: 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 11**).

Figura 11. Avaliação neurocomportamental da resposta de membros anteriores induzidos.



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

Fonte: Adaptado de Freitas, 2018.

Ratos que não demonstraram déficit contralateral de alto grau (escore, 10-11) foram excluídos do estudo posterior. Os testes foram realizados por um observador cego para os grupos de tratamento em 60 min (durante o MCAo) e depois nos dias 1, 2, 3, 7 ou 14 após o MCAo, dependendo da série experimental.

5.4 Aquisição de ressonância magnética e análise dos volumes totais da lesão, núcleo e penumbra

A ressonância magnética *ex vivo* de alta resolução foi realizada em cérebros fatiados fixados em paraformaldeído a 4% no dia 3, 7 ou 14 usando um instrumento de calibre horizontal 11.7T Bruker Advance de 8,9 cm equipado com uma bobina receptora de 89 mm (ID) (Bruker Biospin, Billerica, MA). A imagem ponderada em T2 (T2WI) e os mapas de relaxamento T2 foram calculados conforme descrito anteriormente (GHOSH *et al.*, 2012). Usamos a divisão hierárquica da região (HRS) para identificar automaticamente os volumes do núcleo e da penumbra (lesão total = núcleo + penumbra) a partir dos mapas de relaxamento T2. Nossa determinação de tecido central e penumbral usando HRS (implementado em Matlab) foi validada anteriormente pelo uso de subtrações de imagem ponderada por perfusão/imagem ponderada por difusão em cada nível do cérebro (GHOSH *et al.*, 2012). A penumbra da HRS foi definida usando os valores de T2 (ms), que estavam entre o tecido cerebral de aparência normal e o núcleo isquêmico. Os dados de cada modalidade foram resumidos por grupo.

5.5 Protocolos experimentais e tratamentos

5.5.1 Drogas utilizadas

A preparação do DHA (Cayman®, Ann Arbor, MI) se deu pela sua diluição em solução salina 0,9%. O LAU-0901 foi dissolvido em ciclodextrina a 45%. AT-NPD1 foi dissolvido em solução salina a 0,9%. NPD1 e RvD1 (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, Michigan, EUA) foram dissolvidos em solução salina 0,9% e administrados (IV) na veia femoral 3 h após o início do AVC a uma taxa constante durante 3 min usando uma bomba de infusão.

5.5.2 Séries experimentais

Foram realizadas três séries de experimentos e em todas foram feitas avaliações neurocomportamentais e obtidas imagens por ressonância magnética.

5.5.2.1 Primeira série de experimentos

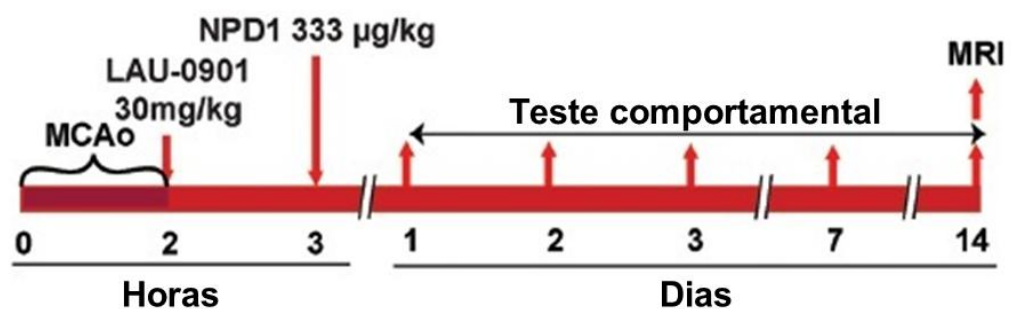
Na primeira série de experimentos os ratos foram aleatoriamente designados para os seguintes grupos de tratamento:

- LAU-0901 (IP, 30 ou 60 mg/kg, 2 h após o início do AVC);
- NPD1; 333 µg/kg;
- AT-NPD; 333 µg/kg);
- DHA; 5 mg/kg;
- Veículo (0,9% soro fisiológico).

Nessa primeira série de experimentos foram aplicados os três protocolos a seguir:

- Efeito de LAU-0901 + NPD1: LAU-0901 (30 mg/kg) e NPD1 sozinho ou em combinação; o comportamento foi avaliado nos dias 1, 2, 3, 7 e 14, seguido de ressonância magnética *ex vivo* no dia 14 (Figura 12);

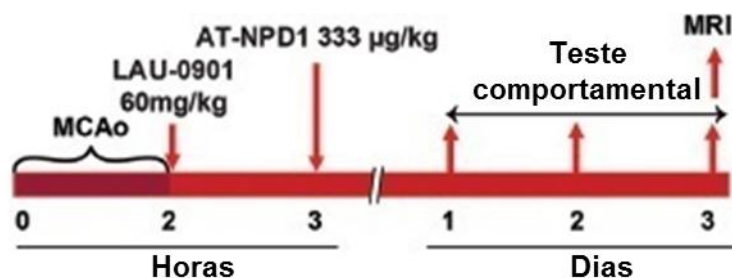
Figura 12. Protocolo 1 da série 1.



Fonte: Elaborado pela autora.

- Efeito de LAU-0901 + AT-NPD1: LAU-0901 (60 mg/kg) e AT- NPD1 sozinho ou em combinação; o comportamento foi avaliado nos dias 1, 2 e 3, seguido por ressonância magnética *ex vivo* no dia 3 (**Figura 13**);

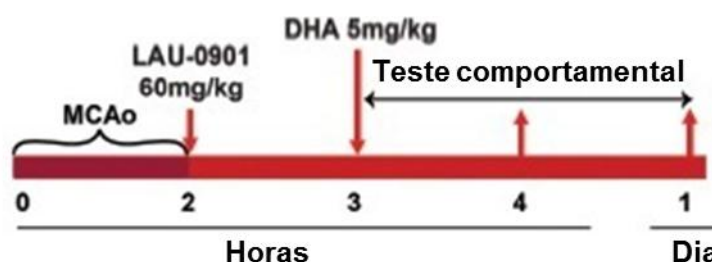
Figura 13. Protocolo 2 da série 1.



Fonte: Elaborado pela autora.

- Efeito de LAU-0901 + DHA: LAU-0901 (60 mg/kg) e DHA sozinho ou em combinação; comportamento foi avaliado em 4 h e no dia 1, seguido por análises lipidômicas no dia 1.

Figura 14. Protocolo 3 da série 1.



Fonte: Elaborado pela autora.

NPD1, AT-NPD1 e DHA foram administrados por via intravenosa 3 h após o início da MCAo a uma taxa constante durante 3 min usando uma bomba de infusão. Todos os tratamentos foram administrados por pesquisadores cegos para os grupos de tratamento.

5.5.2.1.1 Amostragem cerebral e análise lipidômica

Os ratos foram eutanaziados no dia 1 para investigar o efeito de LAU-0901 mais DHA na expressão de diferentes mediadores lipídicos no núcleo isquêmico e na penumbra. Os cérebros foram removidos, divididos em hemisférios direito e esquerdo, e a penumbra (córtex) e núcleo (subcórtex) foram dissecados ao nível do bregma – 0,3 mm para análise lipidômica. Foram extraídos os seguintes lípidos: prostaglandinas (PGE_2 , $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$, 6-ceto- $\text{PGF}_1\text{-}\alpha$, PGD_2), ácido hidroioctadecadienóico (HODE), 11-desidro-tromboxano B2, tromboxano B2 (TXB2), ácido 12-hidroieicosatetraenóico (12-HETE). Eles foram caracterizados por cromatografia líquida-detecção de matriz de fotodiodos-ionização por eletrospray-espectrometria de massa em tandem (MS/MS) usando um espectrômetro de massa

em tandem de três estágios quântico TSQ ultra performance cromatografia líquida-MS/MS da Thermo Electronic Company, Inc., no modo SRM, e os resultados foram normalizados para proteína total da amostra (BAZAN *et al.*, 2012).

5.5.2.2 Segunda série de experimentos

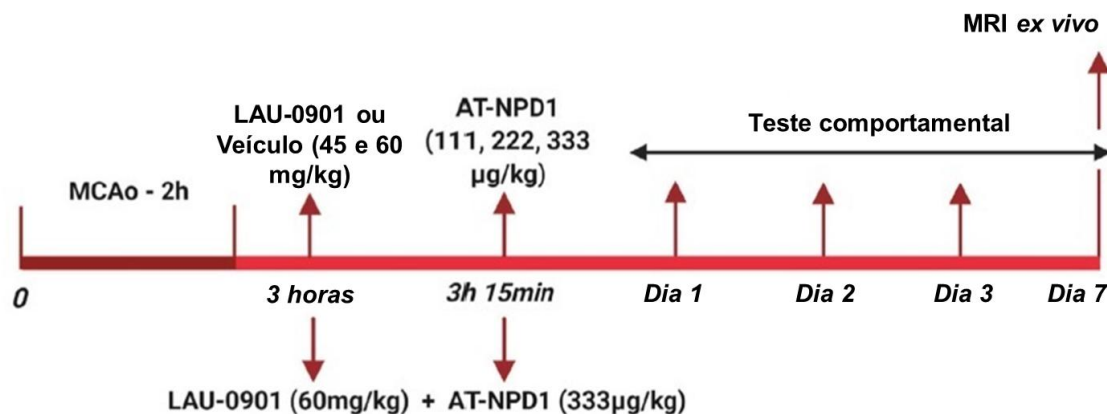
5.5.2.2.1 Estudo de dose-resposta

O LAU-0901 foi administrado por via intraperitoneal (IP) 3 h após o início do AVC. AT-NPD1 foi dissolvido em solução salina a 0,9% e administrado por via intravenosa (IV) 15 min após a entrega de LAU-0901. O veículo (ciclodextrina a 45% e solução salina a 0,9%) foi administrado em 3 h e 3,15 h. LAU-0901 foi administrado primeiro às 3 h e AT-NPD1 às 3h 15min.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos (n=5–8 por grupo):

- LAU-0901 (45 e 60 mg/kg, IP);
- AT-NPD1 (111, 222, 333 µg/kg, IV);
- LAU-0901 (60 mg/kg, IP) + AT-NPD1 (333 µg/kg, IV);
- Veículo.

Figura 15. Estudo de dose-resposta da série 2.



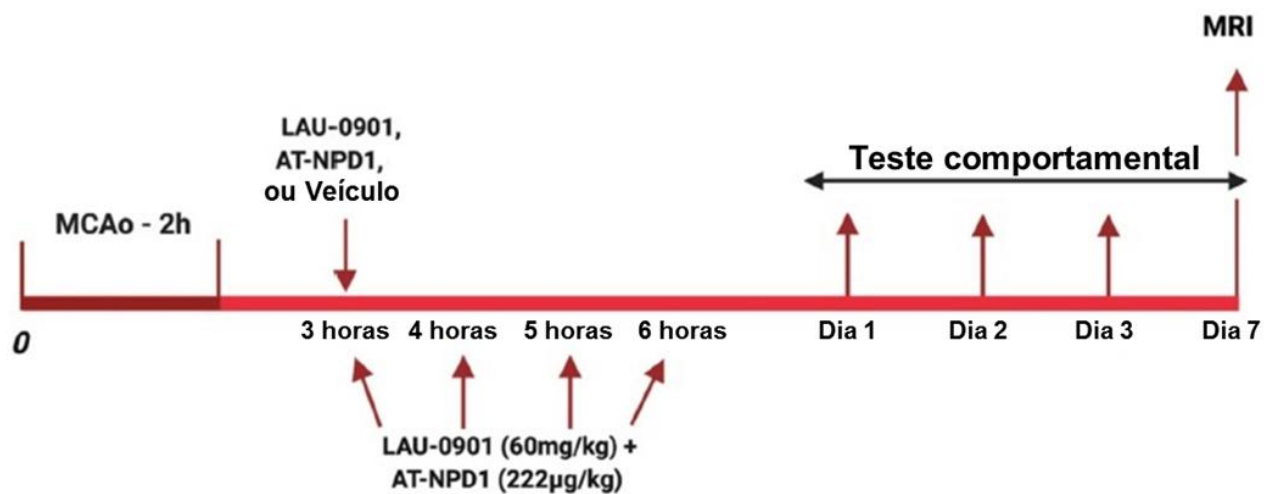
Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.2.2.2 Estudo de janela terapêutica

O estudo dose-resposta mostrou que LAU-0901 (60 mg/kg) e AT-NPD1 (222 µg/kg) eram altamente neuroprotetores; assim, essas doses foram aplicadas. LAU-0901 (60 mg/kg, IP) e AT-NPD1 (222 µg/kg, IV) foram administrados 3 h e 3,15 h, respectivamente, após o

início do AVC. LAU-0901+AT-NPD1 foi administrado em 3, 4, 5 e 6 h após o início da MCAo (n=5–9 por grupo). LAU-0901 foi administrado primeiro e AT-NPD1 15 min após a entrega de LAU-0901. O veículo (ciclodextrina a 45% e solução salina a 0,9%) foi administrado em 3 h e 3,15 h, respectivamente. Em ambos os estudos, o teste de comportamento foi conduzido nos dias 1, 2, 3 e 7, seguido de ressonância magnética *ex vivo* no dia 7. Todos os tratamentos foram administrados por pesquisadores cegos para os grupos de tratamento.

Figura 16. Estudo de janela terapêutica da série 2.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.2.3 Terceira série de experimentos

NPD1 e RvD1 (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, Michigan, EUA) foram dissolvidos em solução salina 0,9% e administrados (IV) na veia femoral 3 h após o início do AVC a uma taxa constante durante 3 minutos usando uma bomba de infusão. NPD1 foi administrado primeiro às 3 horas e depois RvD1 15 minutos depois para tratamento combinado. O veículo (solução salina a 0,9%) foi administrado em 3 h. Todos os experimentos foram feitos por pesquisadores cegos para os grupos de tratamento. O RvD1 foi incluído nos experimentos por ser um mediador lipídico anti-inflamatório endógeno envolvido em doenças neurodegenerativas, como a aterosclerose (MIAO *et al.* 2021).

5.5.2.3.1 Estudo de dose-resposta

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos: NPD1 (111, 222 ou 333 µg/kg), RvD1 (111, 222 ou 333 µg/kg), NPD1+RvD1 (333 µg/kg) e solução salina. O teste de comportamento foi conduzido, seguido por uma ressonância magnética *ex vivo* no dia 7. N = 4-10 em cada grupo.

5.5.2.3.2 Estudo de janela terapêutica

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos:

- Veículo;
- NPD1 (222 µg/kg) administrado 3 h após o início da MCAo;
- RvD1 (222 µg/kg) administrado 3 h após o início da MCAo;
- NPD1+RvD1 administrado 3 h após o início da MCAo;
- NPD1+RvD1 administrado 4 h após o início da MCAo;
- NPD1+RvD1 administrado 5 h após o início da MCAo;
- NPD1+RvD1 administrado 6 h após o início da MCAo.

O teste de comportamento foi conduzido, seguido por uma ressonância magnética *ex vivo* no dia 7. N = 5-10 em cada grupo.

5.6 Análise estatística

Os valores são relatados como média \pm erro padrão da média. O teste *t* de Student bicaudal foi usado para comparações de dois grupos. Para comparações de grupos múltiplos, foi realizada análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) seguida de testes de Bonferroni.

O tamanho da amostra para cada grupo nos experimentos foi determinado usando uma análise de poder. A análise de poder, a priori, foi realizada usando G*Power versão 3.1.9.7 (FAUL *et al.*, 2007) para estimativa do tamanho da amostra com base em dados neurológicos de um estudo anterior (BELAYEV *et al.*, 2018). Com um critério de significância de $\alpha = 0,05$ e poder = 0,80, o tamanho amostral mínimo necessário com esse tamanho de efeito é $n = 3$ para o teste Wilcoxon-Mann Whitney de dois grupos. Assim, o tamanho da amostra obtido de $n = 4-10$ para resposta à dose e estudos de janela terapêutica é mais do que adequado.

Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$.

Todas as estatísticas foram analisadas e representadas graficamente com o pacote Graph Pad Prism versão 9 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA).

6 RESULTADOS

6.1 Primeira série de experimentos

6.1.1 Variáveis fisiológicas e mortalidade

As temperaturas retal e craniana (músculo temporal), gasometria arterial e glicose plasmática não mostraram diferenças significativas entre todos os grupos. Não foram observados efeitos colaterais comportamentais adversos após a administração de LAU-0901, NPD1, AT-NPD1 ou DHA em todos os grupos. Nenhum animal morreu durante este estudo.

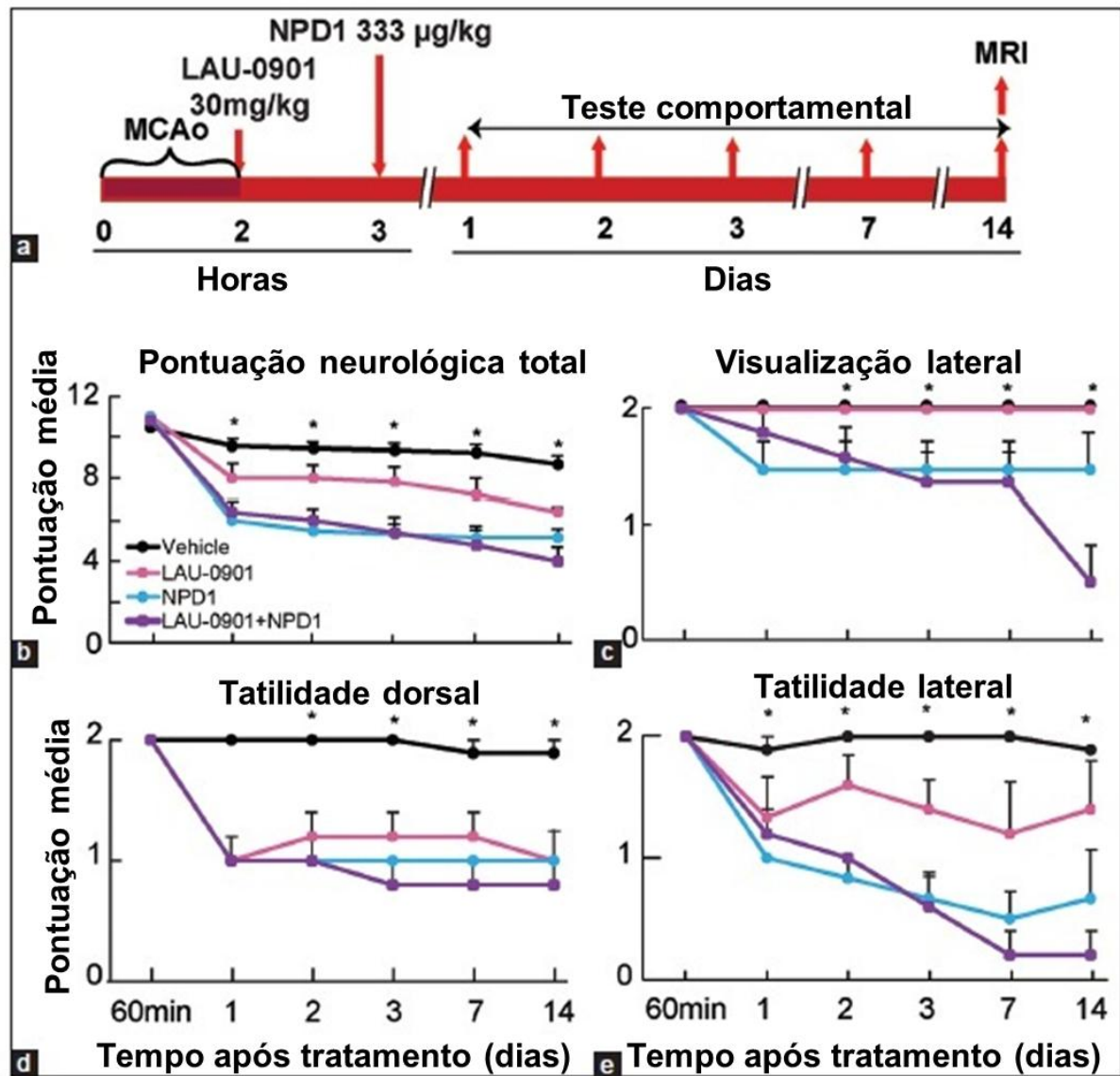
6.1.2 LAU-0901 + NPD1 melhorou a função comportamental e atenuou o dano cerebral isquêmico 14 dias após oclusão da artéria cerebral média

Foi investigado se os tratamentos com LAU-0901 e NPD1 sozinhos, bem como o tratamento combinado com LAU-0901 + NPD1, afetam o comportamento e o tamanho do infarto após isquemia cerebral 14 dias após a terapia, conforme desenho experimental apresentado na **Figura 17a**. Os tratamentos LAU-0901 e NPD1 sozinhos melhoraram as pontuações comportamentais começando no dia 1 em 16% e 37%, que persistiram até o dia 14 em 26% e 40% em comparação com o grupo veículo (**Figura 17b**). A pontuação comportamental foi significativamente diferente entre os tratamentos LAU-0901 + NPD1 e LAU-0901, mas não entre os tratamentos LAU-0901 + NPD1 e NPD1 isoladamente porque teve efeito máximo. Os tratamentos combinados e sozinhos melhoraram notavelmente os cursos de tempo para a recuperação das reações visuais táteis dorsais e laterais dos membros anteriores contralaterais entre os dias 2-14 (**Figuras 17c-e**).

Núcleo isquêmico, penumbra e volumes totais da lesão foram calculados a partir de mapas T2 no dia 14 são apresentados na **Figura 18**. T2WI revelou grandes lesões e hiperintensidades T2, que foram observadas no núcleo isquêmico e na penumbra de ratos tratados com veículo, consistentes com a formação de edema. Em contraste, todos os tratamentos, especialmente NPD1 e LAU-0901 + NPD1, tiveram volumes de lesão menores que eram visíveis apenas em uma pequena porção do córtex e áreas subcorticais. Os volumes de lesões tridimensionais foram drasticamente reduzidos pelos tratamentos com NPD1 e LAU-0901 + NPD1 em comparação com o grupo veículo (**Figura 18b**). Os volumes quantitativos totais, centrais e de lesão penumbra T2WI foram significativamente reduzidos por todos os tratamentos em comparação com o grupo tratado com veículo (**Figura 18c**). O

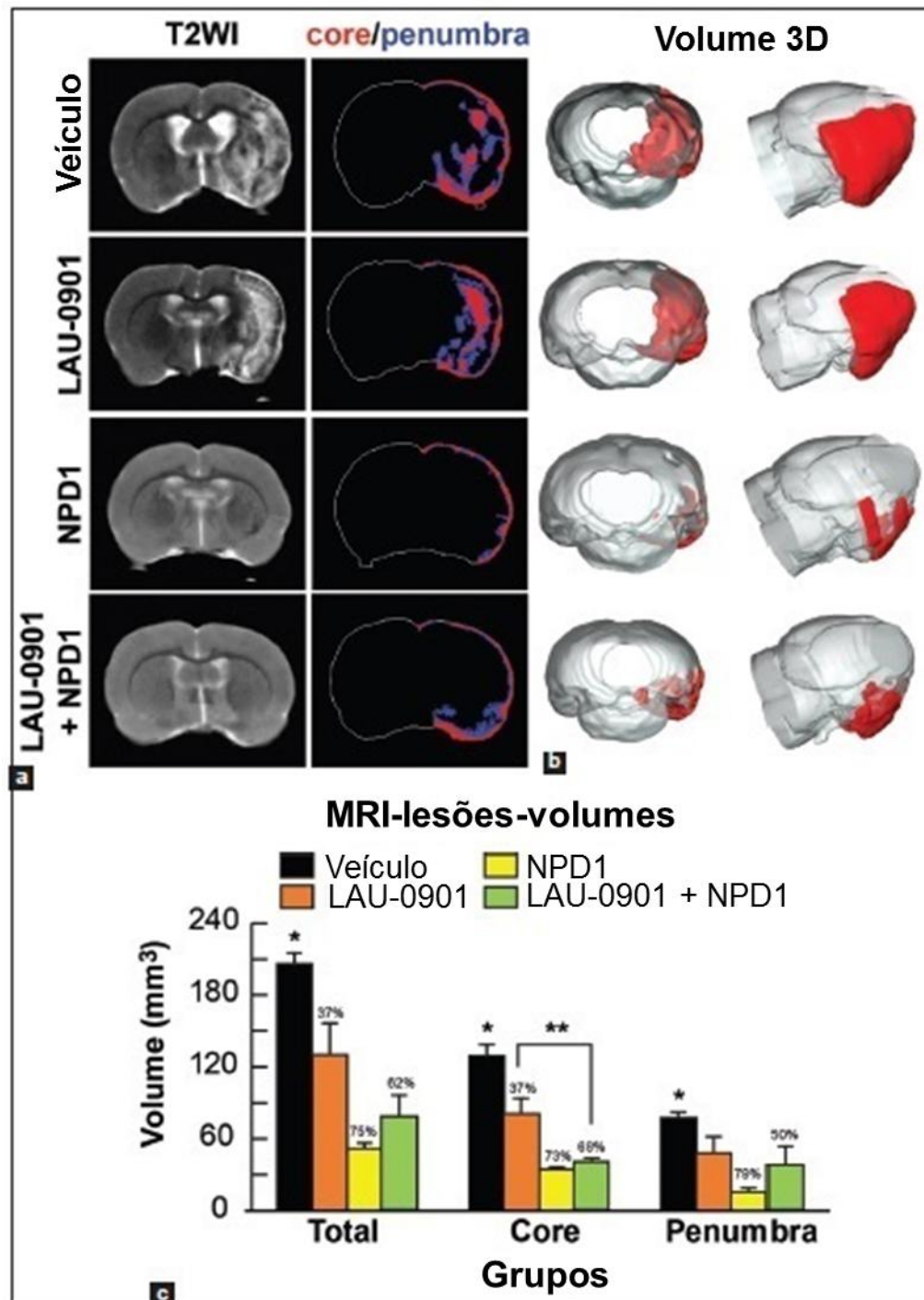
tratamento combinado foi significativamente diferente do tratamento LAU-0901 sozinho na redução de lesões no núcleo isquêmico (**Figura 18c**).

Figura 17. LAU-0901 + NPD1 melhora o comportamento 14 dias após o AVC.



(a) Desenho experimental. (b) pontuação neurológica total (normal = 0, máx = 12) e (c-e) tempo de recuperação das reações dos membros anteriores. $p < 0,05$, *Veículo *versus* todos os tratamentos; $n = 5-6$ /grupo.

Figura 18. LAU-0901 (30mg/kg) + NPD1 (333 μ g/kg) reduz os volumes de lesões de AVC derivadas da ressonância magnética.

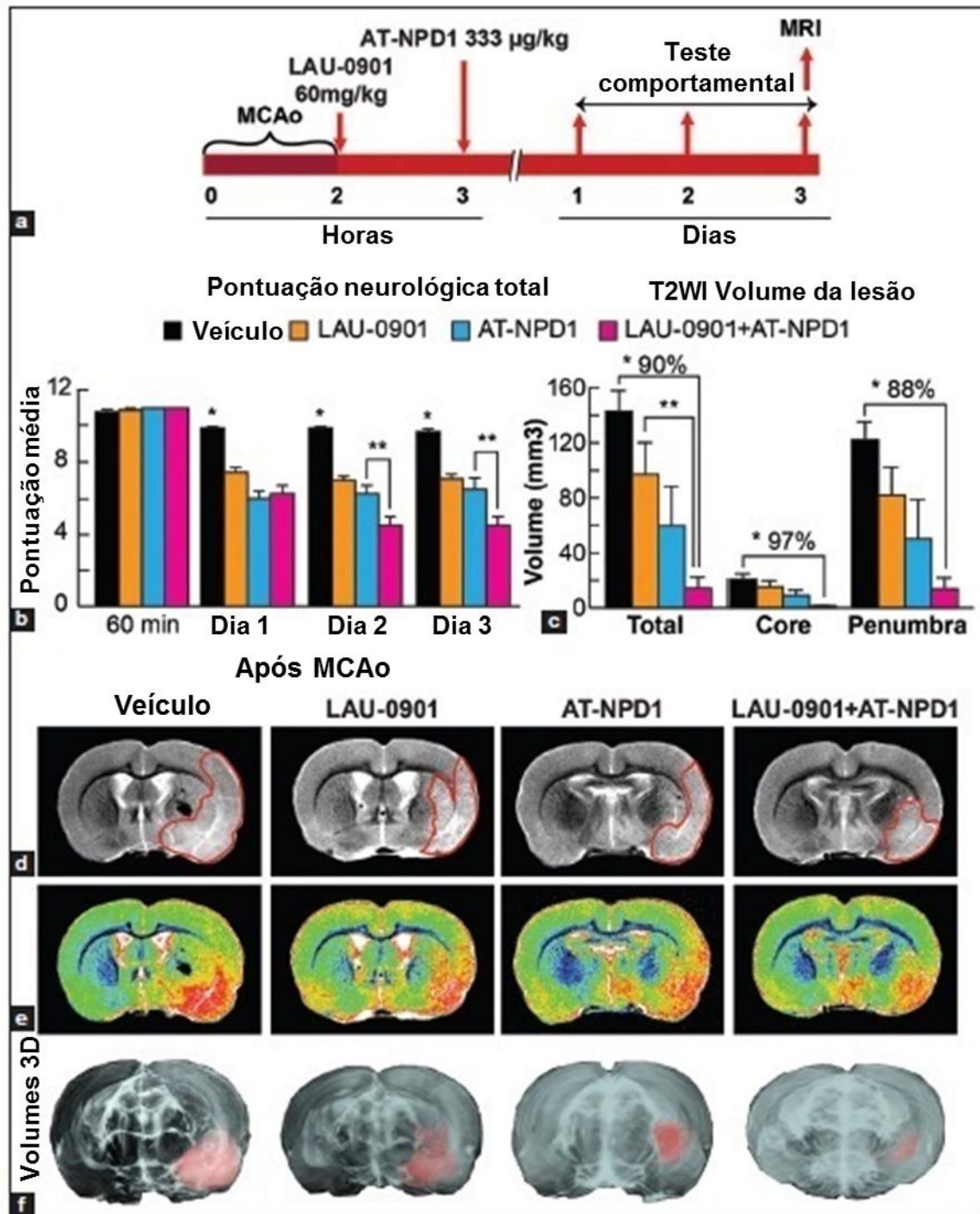


(a) Imagem ponderada em T2 representativa, núcleo/penumbra, e (b) Volumes de lesão tridimensionais calculados a partir de mapas T2 no dia 14. Os tecidos centrais (vermelho) e penumbral (azul) foram identificados automaticamente. (c) Núcleo isquêmico, penumbra e volumes totais da lesão. $p < 0,05$, *Veículo *versus* todos os tratamentos; **LAU-0901 *versus* LAU-0901+ neuroprotectina D1, $n = 5-6$ /grupo.

6.1.3 LAU-0901 + AT-NPD1 forneceu neuroproteção 3 dias após a oclusão da artéria cerebral média

O desenho experimental é apresentado na **Figura 19a**. Os tratamentos com LAU-0901 e AT-NPD1 sozinhos melhoraram a pontuação neurológica total começando no dia 1, que persistiu até o dia 3 em 33% e 27% em comparação com o grupo veículo (**Figura 19b**). O tratamento combinado com LAU-0901 + AT-NPD1 melhorou a pontuação comportamental até 54% no dia 3 (**Figura 19b**). Os volumes totais de lesão (calculados a partir de mapas T2) foram reduzidos por todos os tratamentos (**Figura 19c**). O tratamento combinado reduziu o volume total da lesão em comparação com o grupo LAU-0901-sozinho (**Figura 19c**). T2WI representativo, imagens pseudocoloridas e volumes 3D, ilustram que todos os tratamentos reduziram a lesão no núcleo isquêmico e na penumbra em comparação com o veículo (**Figuras 19d-f**). As lesões foram reduzidas pelo tratamento combinado com LAU-0901 + AT-NPD1 e foram principalmente restritas às áreas subcorticais.

Figura 19. LAU-0901 + AT-NPD1 desencadeada por aspirina é protetora 3 dias após o AVC.



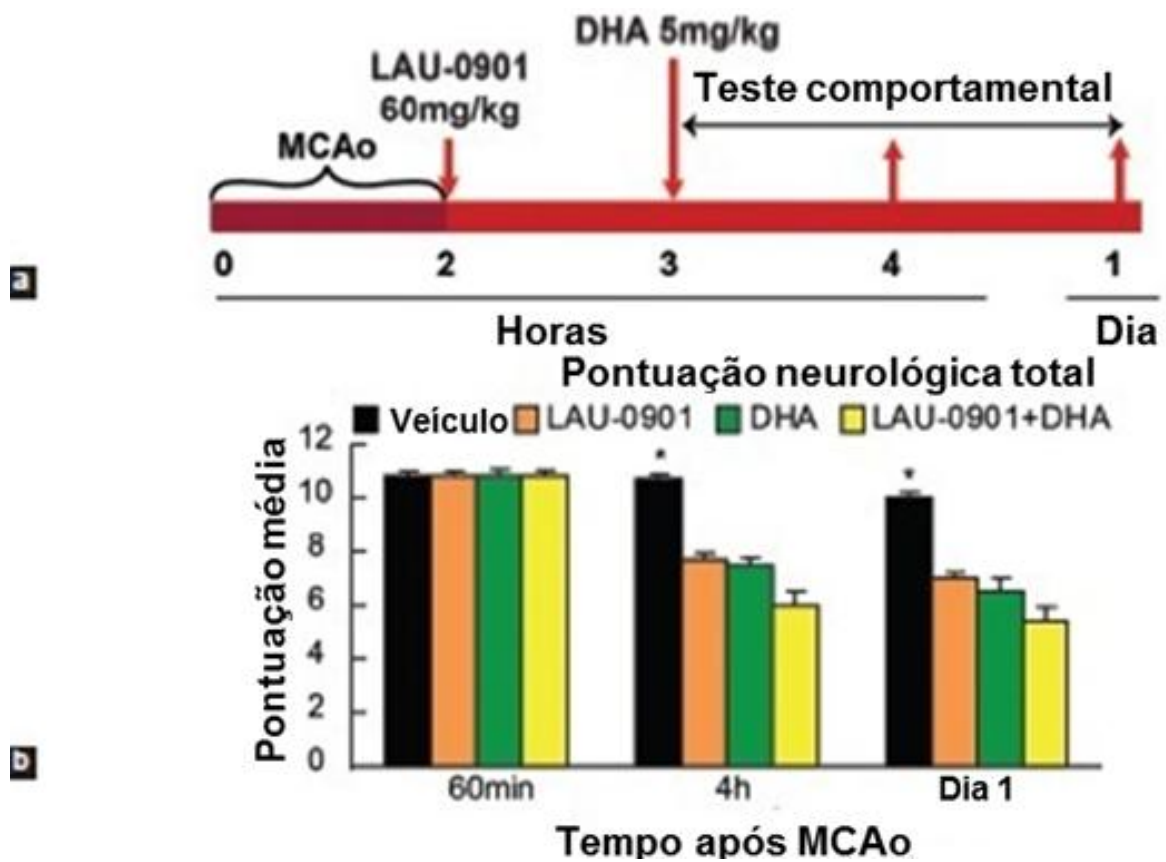
(a) Desenho experimental. (b) Pontuação neurológica total (normal = 0, máx = 12). (c) Volumes de lesão total, central e de penumbra calculados a partir de mapas T2. (d) Imagem ponderada em T2 representativa, (e) imagens T2 pseudocoloridas e (f) volumes de lesão 3D colapsados (vermelho) sobrepostos na imagem ponderada em T2. $p < 0,05$, *Veículo *versus* todos os tratamentos; **LAU-0901+ neuroprotectina D1 *versus* neuroprotectina D1 desencadeada por aspirina ou LAU-0901, $n = 5-7$ /grupo.

6.1.4 LAU-0901 + DHA modula a regulação do fluxo sanguíneo cerebral e a sinalização inflamatória, o que leva à recuperação neurológica 1 dia após a oclusão da artéria cerebral média

Investigamos o efeito do tratamento com LAU-0901 e DHA isoladamente e em combinação no comportamento, bem como na expressão de diferentes mediadores lipídicos 1 dia após o AVC isquêmico, com desenho experimental apresentado na **Figura 20a**. Os tratamentos com LAU-0901 e DHA sozinhos melhoraram as pontuações comportamentais em comparação com os grupos de veículos em 30%-35% (**Figura 20b**). O efeito neuroprotetor foi aumentado usando o LAU-0901 + DHA em 47% no dia 1.

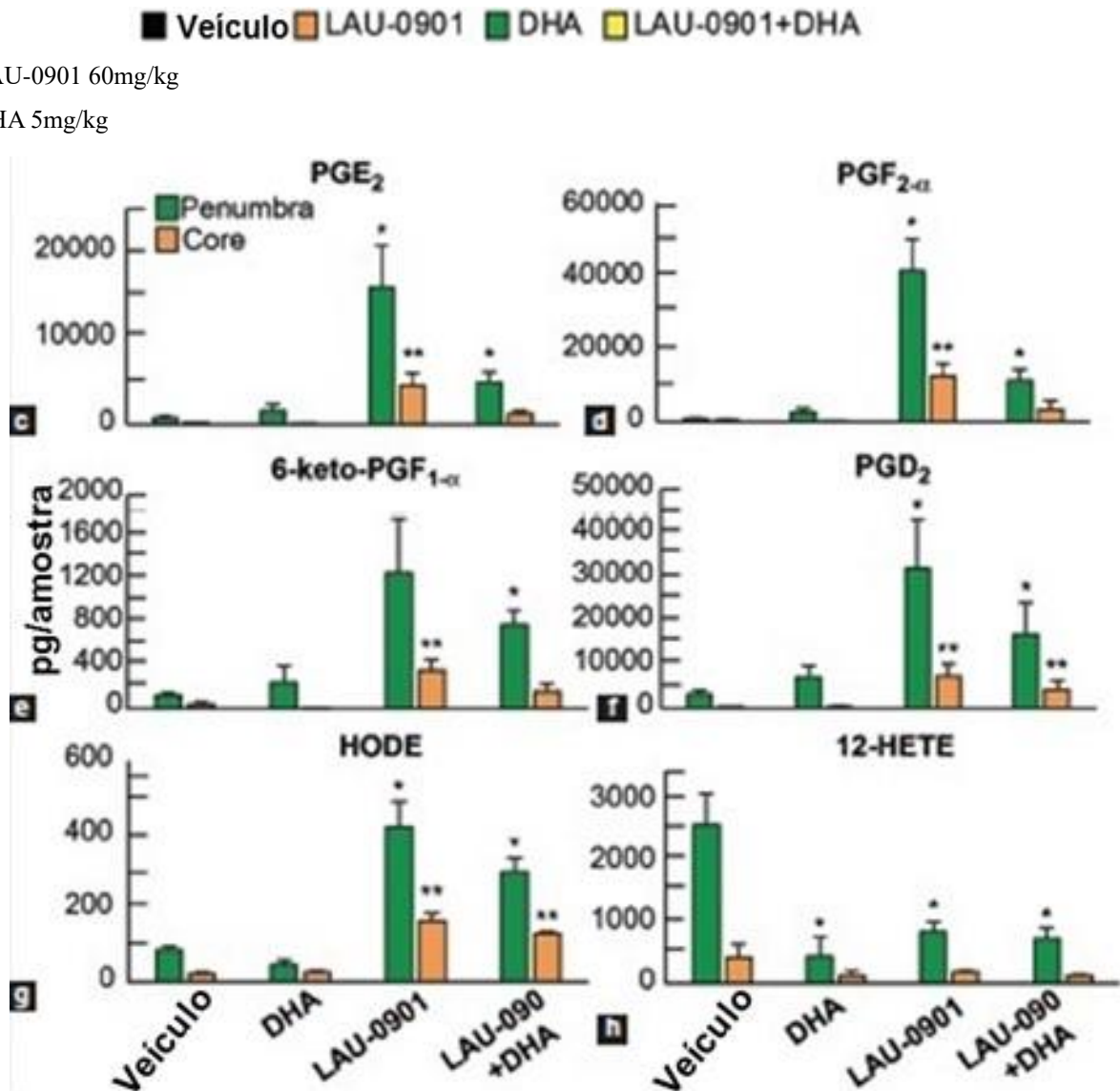
A expressão de prostaglandinas (PGE_2 , $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$, 6-ceto- $\text{PGF}_1\text{-}\alpha$ e PGD_2), HODE e 12-HETE do núcleo isquêmico ipsilateral e da penumbra são apresentadas na **Figuras 20c-h**. A maior regulação positiva foi observada em regiões de penumbra por LAU-0901 sozinho e em combinação com DHA. O aparecimento de prostaglandinas quando tratado apenas com LAU-0901 aumentou 18 vezes para PGE_2 , 47 vezes para $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$, 10 vezes para 6-ceto- $\text{PGF}_1\text{-}\alpha$ e 25 vezes para PGD_2 . Quando tratado com LAU-0901 + DHA, foi observado um aumento de 6 vezes para PGE_2 , 13 vezes para $\text{PGF}_2\text{-}\alpha$, 6 vezes para 6-ceto- $\text{PGF}_1\text{-}\alpha$ e 14 vezes para PGD_2 em comparação com o veículo (**Figuras 20c-f**). A expressão de HODE aumentou 5 vezes com o tratamento LAU-0901 sozinho e 4 vezes com LAU-0910 + DHA (**Figura 20g**). A expressão de 12-HETE foi reduzida por DHA, LAU-0901 e LAU-0901 + DHA (83, 67, 72%, respectivamente) (**Figura 20h**).

Figura 20. Associação de LAU-0901 + DHA melhora o comportamento e modula a resposta inflamatória 1 dia após o AVC.



(a) Desenho experimental. (b) Pontuação neurológica total.

LAU-0901 60mg/kg
DHA 5mg/kg



(c-h) Análise quantitativa de extratos lipídicos após oclusão da artéria cerebral média do núcleo isquêmico e da penumbra. $p < 0,05$, *Todos os tratamentos versus veículo (penumbra); **Todos os tratamentos versus veículo (núcleo), $n = 3-4$ /grupo.

6.2 Segunda série de experimentos

6.2.1 Variáveis fisiológicas e mortalidade

Todos os animais deste estudo apresentaram valores semelhantes para temperatura retal e craniana, pressão arterial média, gasometria arterial e glicemia, sem diferenças significativas entre os grupos. Nenhum efeito colateral comportamental adverso foi observado após a administração de LAU-0901, AT-NPD1 ou LAU-0901 + AT-NPD1. Estudo dose-resposta: nenhum rato morreu em nenhum grupo tratado, exceto três no grupo veículo nos dias 2, 3 e 7. Estudo de janela terapêutica: um total de três ratos morreram (dois ratos no grupo veículo nos dias 1 e 7 e um em LAU-0901+AT-NPD1-3h no dia 2). As autópsias revelaram um grande infarto hemisférico ipsilateral e extenso edema cerebral em todos os animais.

6.2.2 Dose-resposta

O desenho experimental é apresentado na **Figura 21a**. Todos os ratos tiveram uma pontuação neurológica total de 0 antes da isquemia e desenvolveram um déficit comportamental de alto grau (10-11; máximo possível, 12) quando examinados em 60 min de MCAo (**Figura 21b**); assim, nenhum animal necessitou de exclusão com base em grau inadequado de isquemia cerebral durante a avaliação comportamental. Os ratos tratados com veículo continuaram a exibir deficiências comportamentais graves ao longo do período de sobrevivência de 7 dias. Todos os ratos tratados com diferentes doses de LAU-0901, AT-NPD1 e LAU-0901+AT-NPD1 melhoraram significativamente a pontuação neurológica total em comparação com o veículo nos dias 1, 2, 3 e 7 (**Figura 21b**).

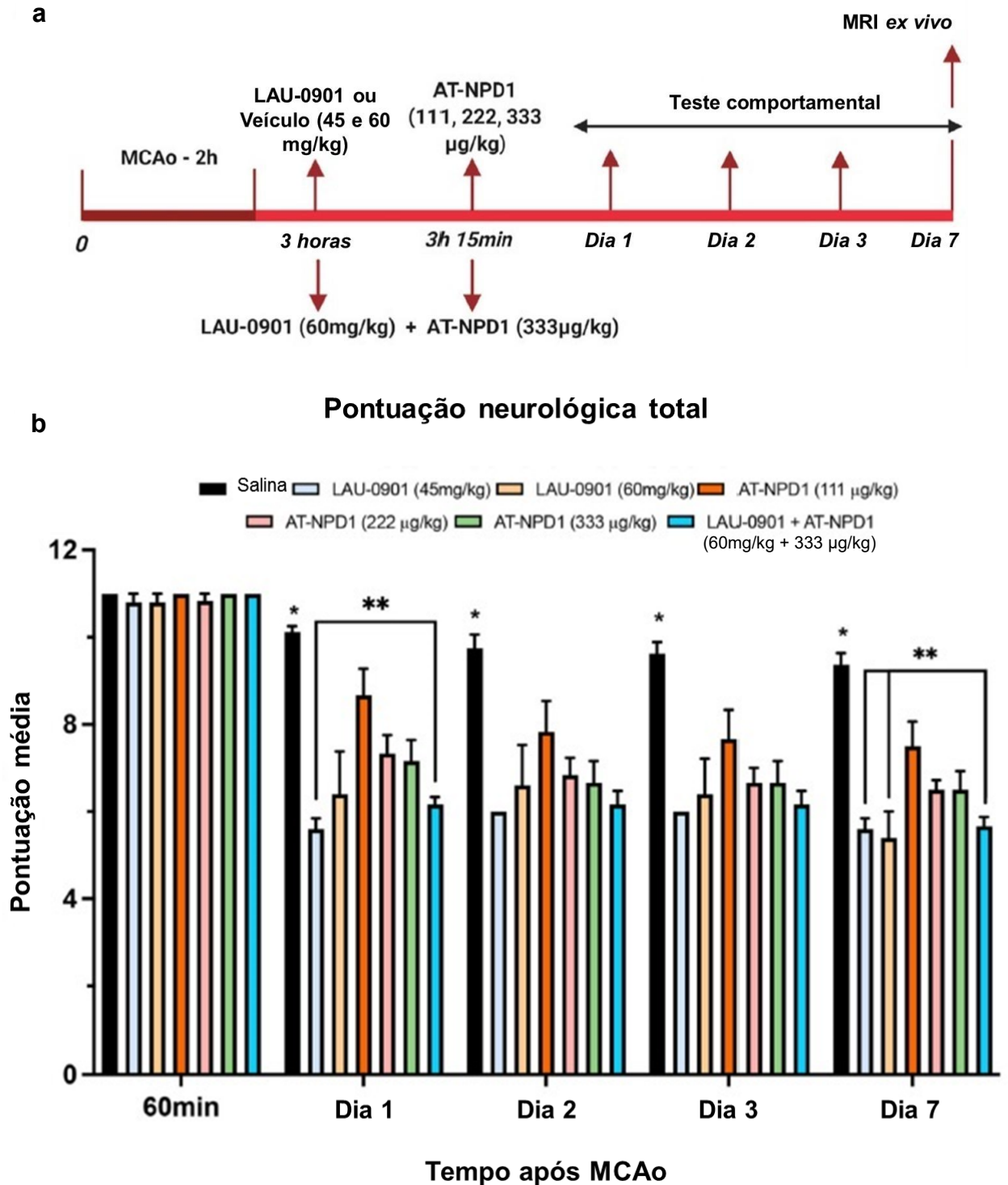
O efeito neuroprotetor foi aprimorado usando LAU-0901+AT-NPD1 em comparação com AT-NPD1 (111 e 222), o que resultou em pontuações comportamentais aprimoradas de 20% e 31% no dia 7 (**Figura 21b**).

As **Figuras 22a-c** mostra a melhora significativa da colocação tátil (dorsal e lateral) e proprioceptiva em momentos diferentes em todos os ratos tratados em comparação com o grupo veículo.

Imagens representativas de T2WI e core/penumbra são apresentadas na **Figura 23a**. Grandes lesões e hiperintensidades T2 foram observadas no núcleo isquêmico e na penumbra de ratos tratados com veículo. Em contraste, todos os tratamentos tiveram menores volumes de lesão, principalmente visíveis no núcleo isquêmico e parcialmente na penumbra. Os

volumes totais, centrais isquêmicos e de lesão de penumbra calculados usando T2WI no dia 7 foram significativamente reduzidos por todos os tratamentos em comparação com o grupo veículo (**Figura 23b**). Os ratos tratados com tratamento combinado apresentaram lesões menores do que os tratamentos com LAU-0901 e AT-NPD1 sozinhos, mas isso não foi estatisticamente significativo (**Figura 23b**).

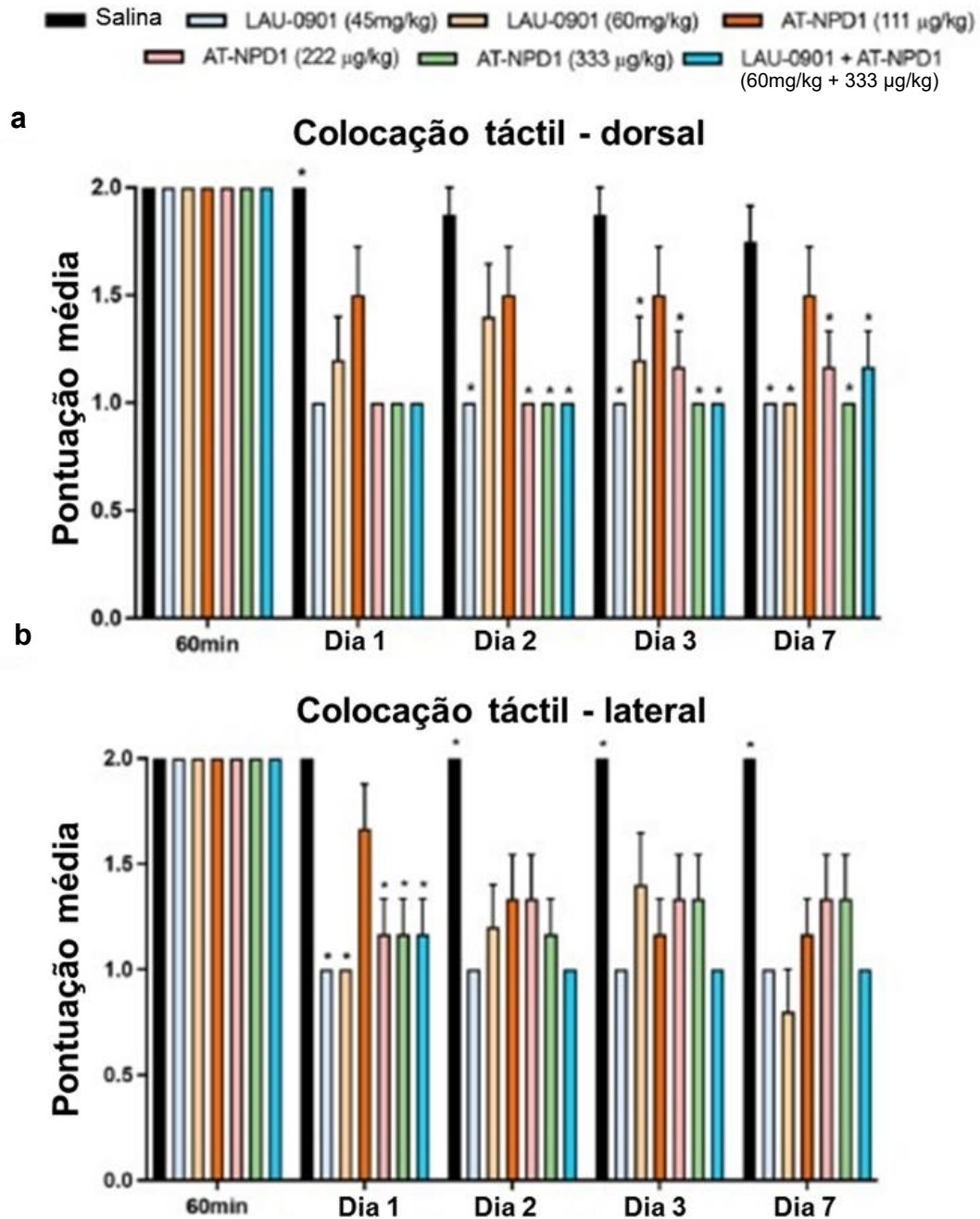
Figura 21. Estudo Dose-Resposta: LAU-0901, AT-NPD1 e sua combinação melhoraram a recuperação funcional após MCAo.

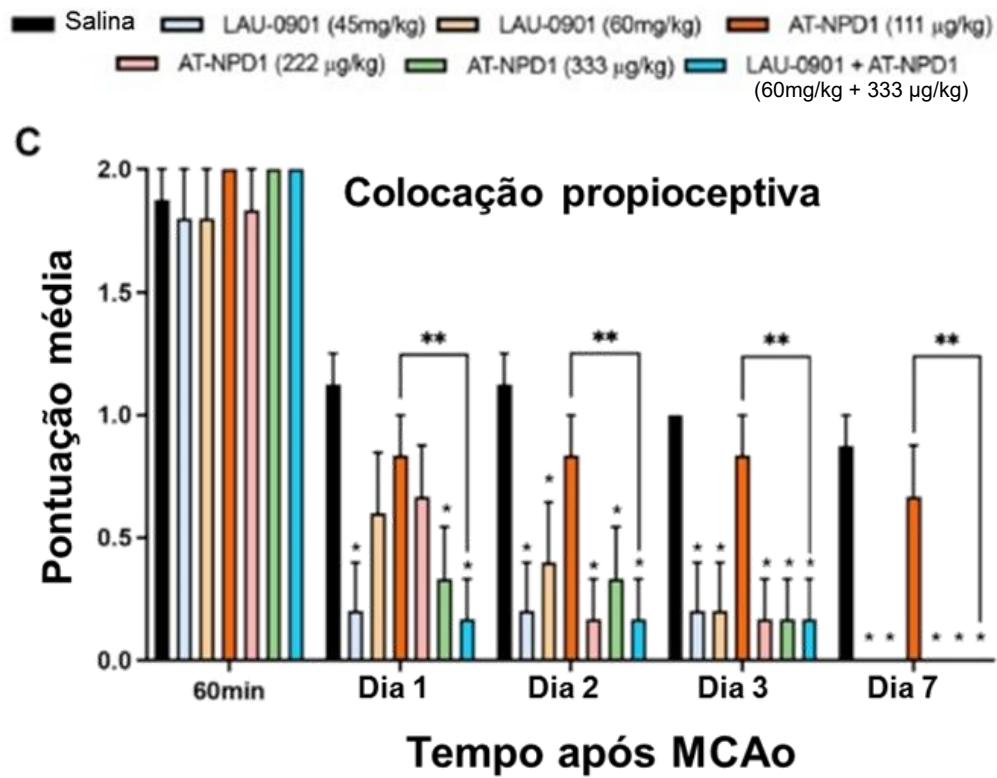


(a) Desenho experimental. (b) Pontuação neurológica total (normal = 0, déficit máximo = 12) em ratos durante MCAo (60 min) e várias vezes após MCAo. Todas as doses de LAU-0901 e AT-NPD1 e o tratamento combinado melhoraram significativamente a pontuação neurológica total nos dias 1, 2, 3 e 7 em comparação com o grupo veículo. Os valores mostrados foram expressos em médias \pm erro padrão ($n=5-8$ por grupo). $*p < 0,05$, veículo

versus todos os tratamentos; **LAU-0901 (45mg/kg) *versus* LAU-0901 + AT-NPD1 e **LAU-0901 (60mg/kg) *versus* LAU-0901 + AT-NPD1 (ANOVA de medidas repetidas seguida de testes de Bonferroni).

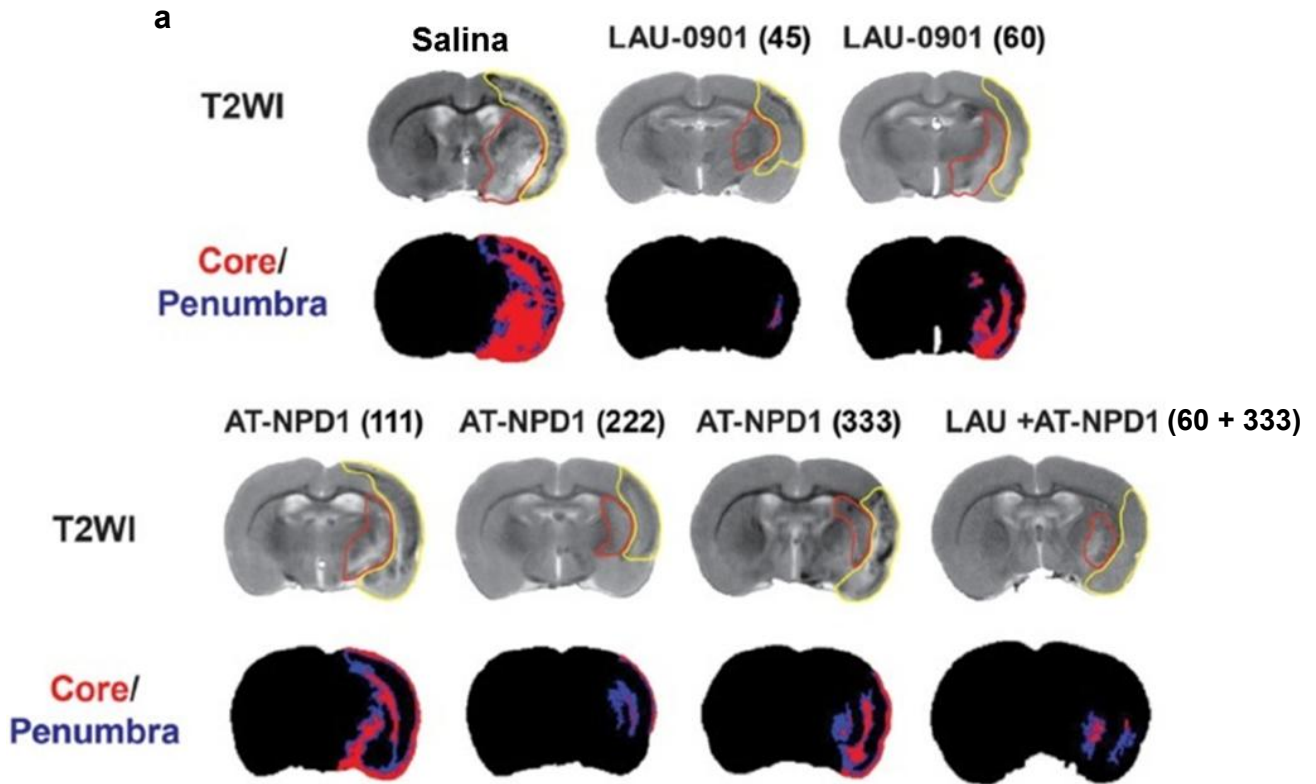
Figura 22. Tempo de recuperação das reações táteis (dorsais e laterais) e proprioceptivas de posicionamento dos membros anteriores.



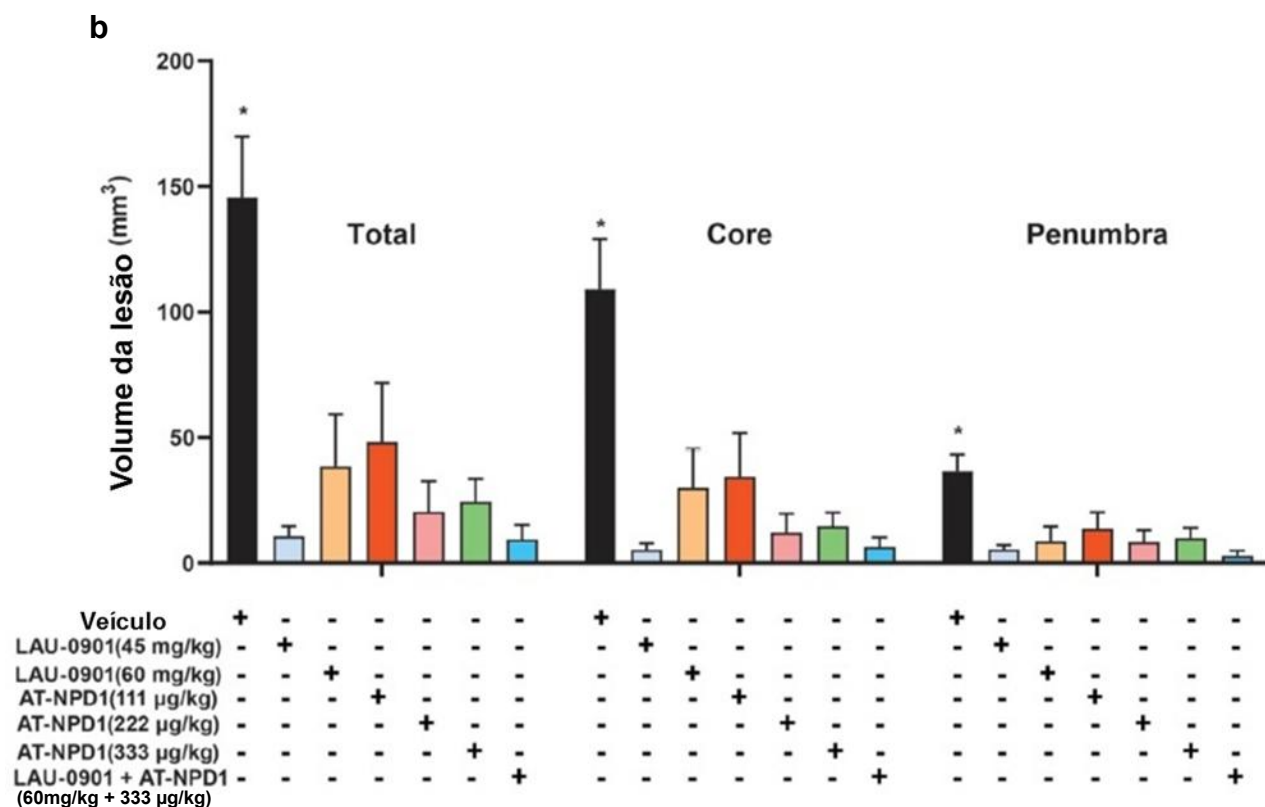


(a-c) Tempo de recuperação das reações táteis (dorsais e laterais) e proprioceptivas de posicionamento dos membros anteriores (normal = 0, déficit máximo = 2). Os valores mostrados foram expressos em médias \pm erro padrão (n=5–8 por grupo). * $p < 0,05$, veículo *versus* todos os tratamentos; ** LAU-0901+AT-NPD1 vs. AT-NPD1 (111 µg/kg) (ANOVA de medidas repetidas seguida de testes de Bonferroni).

Figura 23. LAU-0901, AT-NPD1 e sua combinação atenuaram os volumes das lesões de ressonância magnética e o núcleo isquêmico e a penumbra após o AVC.



(a) Imagens ponderadas em T2 representativas (T2WI) e núcleo/penumbra de cada grupo no dia 7. Os tecidos do núcleo (vermelho) e da penumbra (azul) foram extraídos automaticamente de todo o cérebro usando o método de divisão hierárquica da região da ressonância magnética para identificação da penumbra. Hiperintensidades T2 foram observadas no centro isquêmico e na penumbra de ratos tratados com veículo, consistentes com a formação de edema. Em contraste, todos os animais tratados tinham tamanhos de lesão menores.



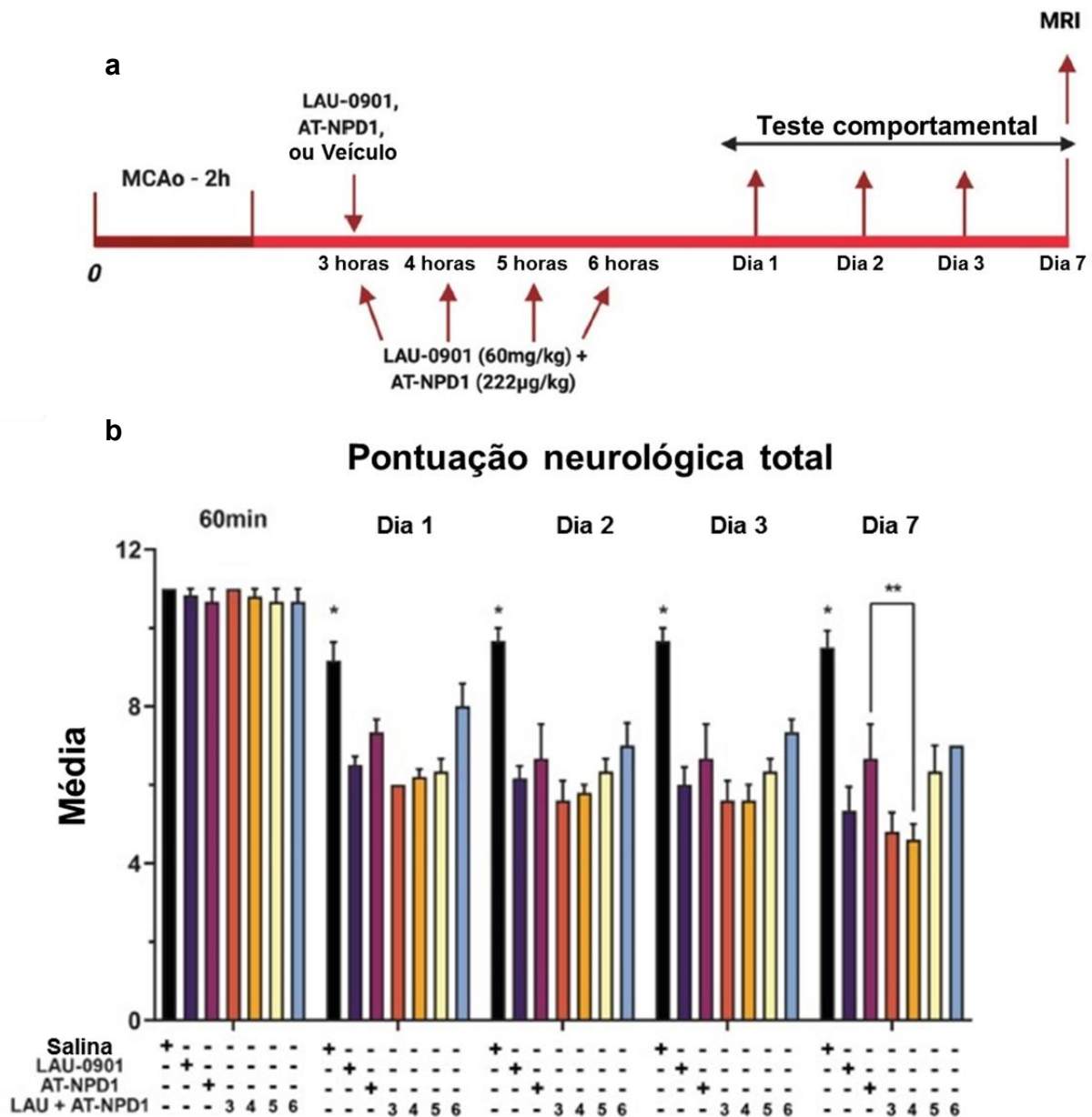
(b) Todos os tratamentos reduziram significativamente os volumes totais de lesão, calculados a partir de T2WI no dia 7 em comparação com o grupo veículo. Os valores mostrados foram expressos em médias \pm erro padrão ($n=5-8$ por grupo). $*p < 0,05$, veículo *versus* todos os tratamentos (ANOVA de medidas repetidas seguida de testes de Bonferroni).

6.2.3 Janela terapêutica

O desenho experimental é apresentado na **Figura 24a**. O tratamento com LAU-0901 e AT-NPD1 sozinho, quando administrado em 3 h, melhorou o escore neurológico total no dia 7 em 43% e 30% (**Figura 24b**). Em contraste, o efeito neuroprotetor foi aumentado usando LAU-0901+AT-NPD1, que melhorou o comportamento em 50% quando administrado em 3 h, 56% em 4 h, 33% em 5 h e 26% em 6 h (**Figura 24b**). O tratamento combinado administrado em 4 h foi significativamente melhor do que AT-NPD1 sozinho (**Figura 24b**). Imagens representativas de T2WI e núcleo/penumbra são apresentadas na **Figura 25**.

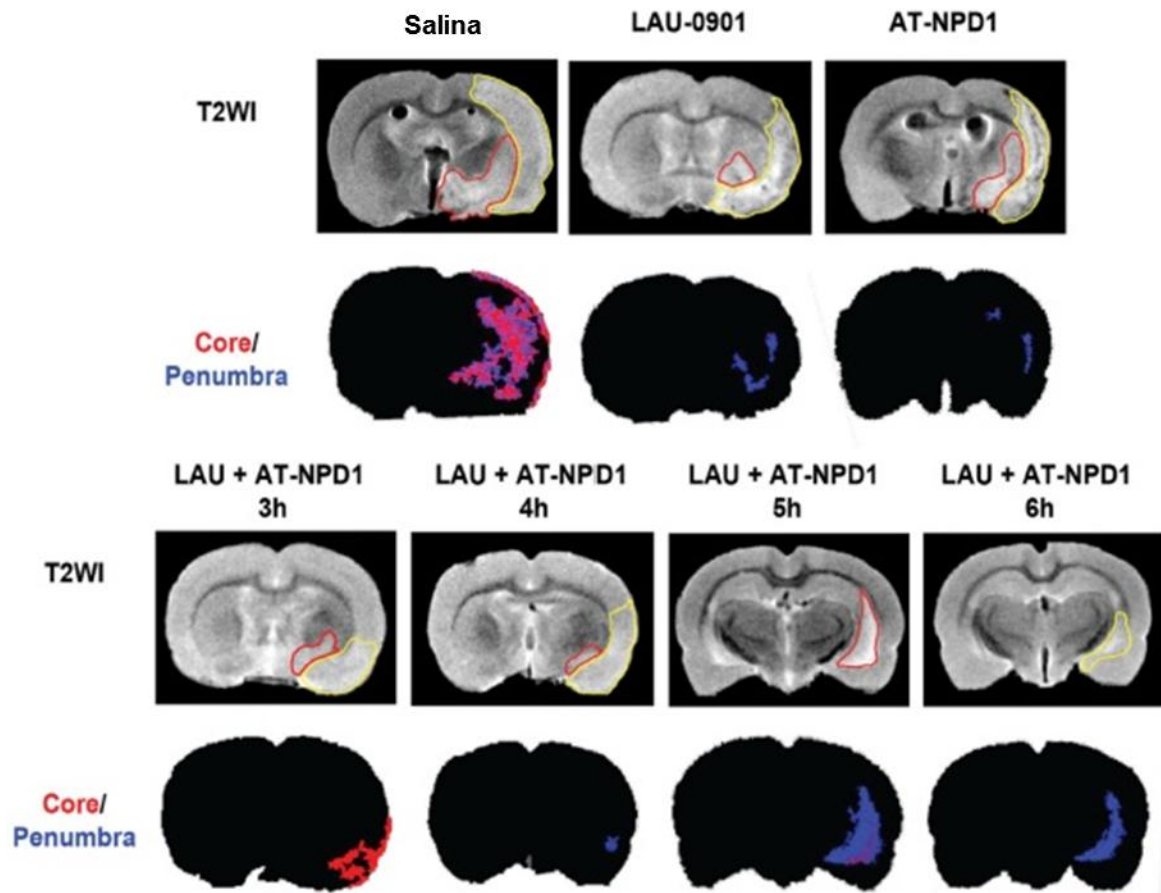
Grandes lesões e hiperintensidades T2 foram observadas no centro isquêmico e na penumbra de ratos tratados com solução salina. Os ratos tratados apenas com LAU-0901 e AT-NPD1 apresentaram lesões menores com envolvimento parcial do córtex e subcortical. Em contraste, as lesões foram reduzidas pelo tratamento combinado administrado em 3, 4, 5 e 6 h e foram principalmente restritas a áreas subcorticais (**Figura 25**). Núcleo isquêmico, penumbra e volumes totais de lesão foram reduzidos por todos os tratamentos quando administrados até 6 h após o início da MCAo (**Figura 26**). Não houve diferenças estatísticas entre todos os grupos de tratamento.

Figura 24. Estudo da janela terapêutica. LAU-0901, AT-NPD1 e sua combinação melhoram os escores neurológicos quando administrados até 6 h após MCAo.



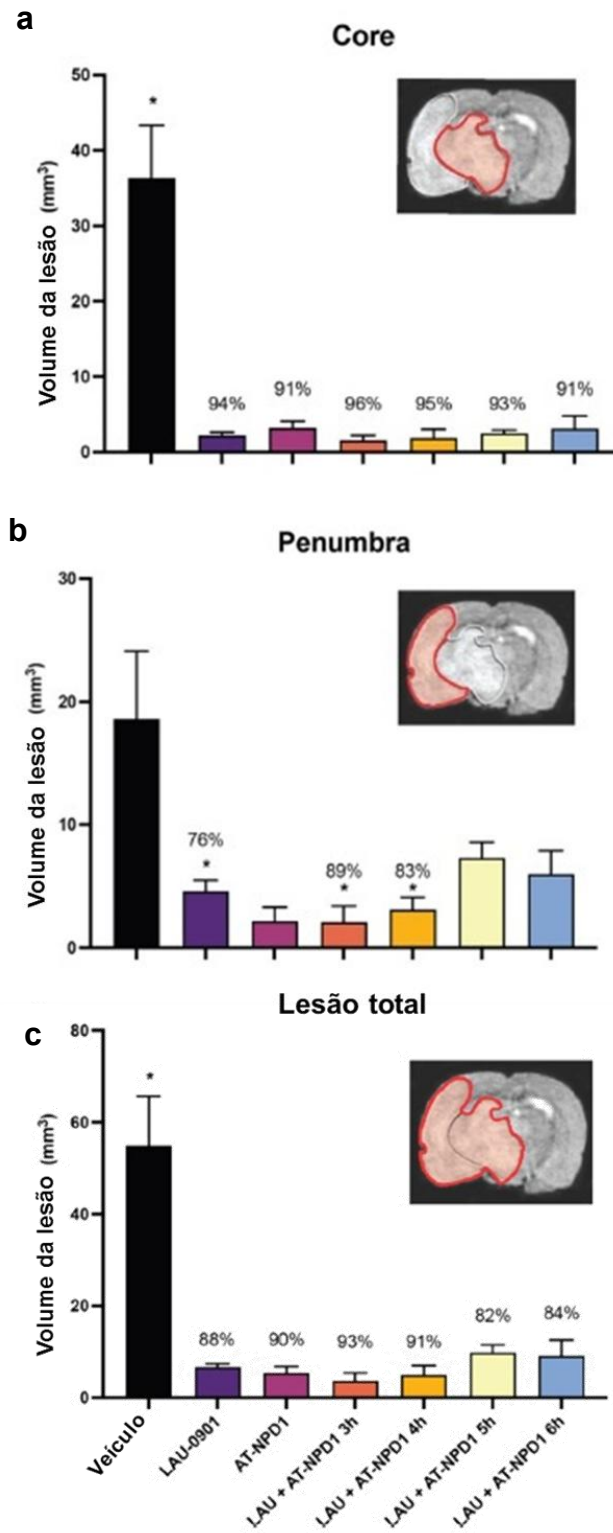
(a) Desenho experimental. (b) Escore neurológico total (normal=0, déficit máximo=12) em todos os grupos. Os valores apresentados foram expressos em médias \pm erro padrão ($n=5-9$ por grupo). * $p < 0,05$, veículo *versus* todos os tratamentos ** LAU-0901+AT-NPD1-4h vs. AT-NPD1 (ANOVA de medidas repetidas seguida de testes de Bonferroni).

Figura 25. LAU-0901 (60mg/kg), AT-NPD1 (222µg/kg) e sua combinação reduzem as lesões de ressonância magnética e protegem o núcleo isquêmico e a penumbra.



T2WI representativo e núcleo/penumbra do veículo e de todos os grupos tratados. Os tecidos do núcleo (vermelho) e da penumbra (azul) foram automaticamente extraídos de todo o cérebro. Hiperintensidades T2 foram observadas no núcleo isquêmico e na penumbra de ratos tratados com veículo, consistentes com a formação de edema. Em contraste, todos os animais tratados tinham tamanhos de lesão menores, localizados principalmente em áreas subcorticais.

Figura 26. Os volumes de lesão cortical, subcortical e total foram calculados a partir de mapas T2WI; LAU-0901 (60mg/kg) + AT-NPD1 (222 μ g/kg).



(a-c) Os volumes de lesão cortical, subcortical e total foram calculados a partir de mapas T2WI. Todos os tratamentos reduziram drasticamente os volumes das lesões. Os valores apresentados foram expressos em médias \pm erro padrão (n=5–9 por grupo). * $p < 0,05$, veículo vs. todos os tratamentos (ANOVA de medidas repetidas seguida de testes de Bonferroni).

6.3 Terceira série de experimentos

As variáveis fisiológicas foram definidas em todos os grupos experimentais e nenhum efeito colateral comportamental adverso foi observado após a administração de NPD1, RvD1 ou NPD1 + RvD1. Quatro animais morreram durante o experimento dose-resposta: dois ratos no grupo salina nos dias 2 e 3, um de cada grupo NPD1 (333 µg/kg) e RvD1 (222 µg/kg) nos dias 2 e 3, respectivamente. Dois ratos morreram durante o estudo da janela terapêutica: grupos salina e NPD1 + RvD1 (ambos em 24 h). As autópsias revelaram grandes infartos hemisféricos ipsilaterais e extenso edema cerebral em todos os ratos.

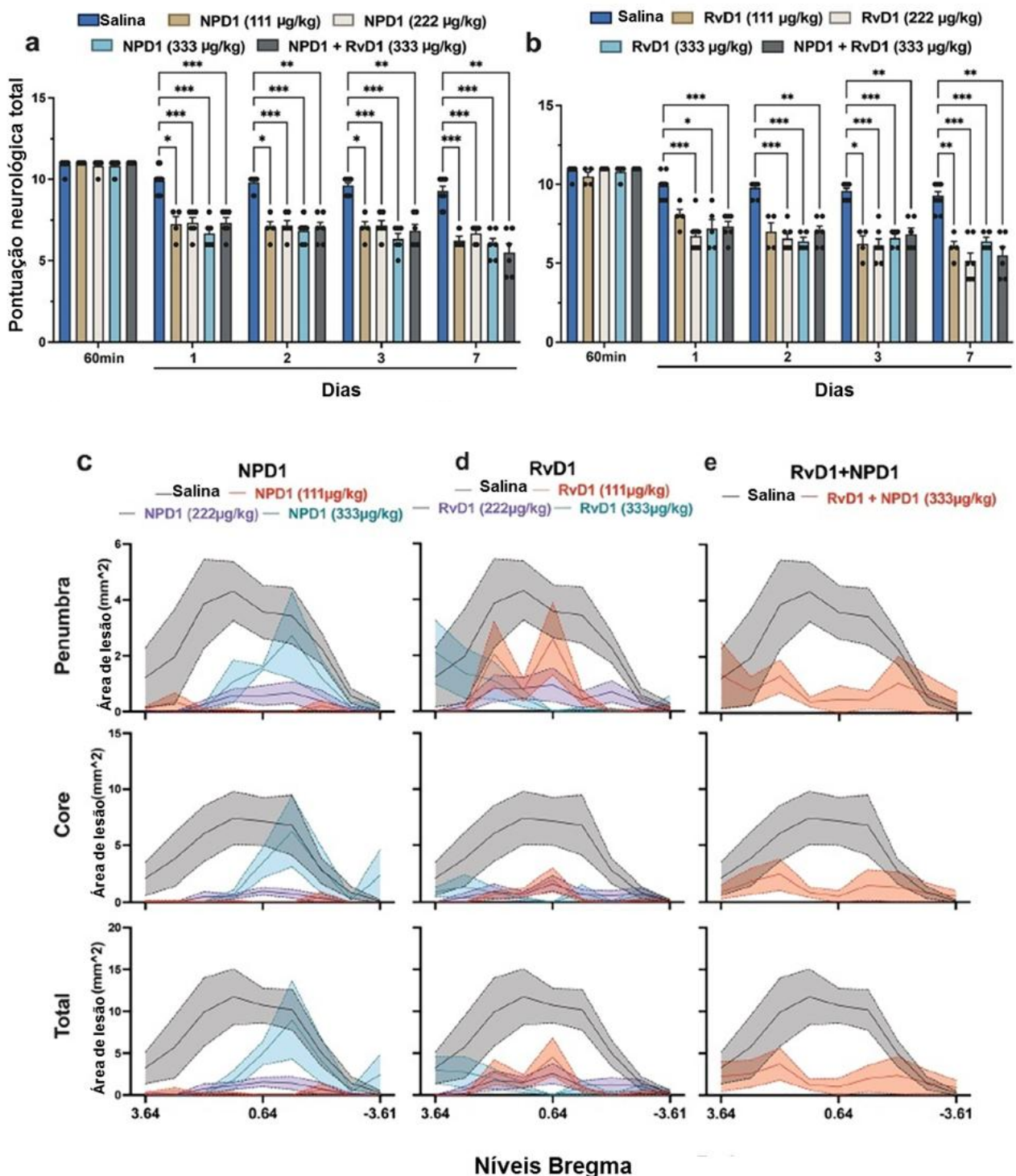
6.3.1 NPD1 + RvD1 dose-resposta e janela terapêutica demonstram neuroproteção melhorando o comportamento e diminuindo a lesão de AVC em T2WI

Todos os animais deste estudo apresentaram valores semelhantes para temperatura retal e craniana, pressão arterial média, gasometria arterial e glicemia, sem diferenças significativas entre os grupos. Nenhum efeito colateral comportamental adverso foi observado após a administração de LAU-0901, AT-NPD1 ou LAU-0901 + AT-NPD1. Estudo dose-resposta: nenhum rato morreu em nenhum grupo tratado, exceto três no grupo veículo nos dias 2, 3 e 7. Estudo de janela terapêutica: um total de três ratos morreram (dois ratos no grupo veículo nos dias 1 e 7 e um em LAU-0901+AT-NPD1-3h no dia 2). As autópsias revelaram um grande infarto hemisférico ipsilateral e extenso edema cerebral em todos os animais.

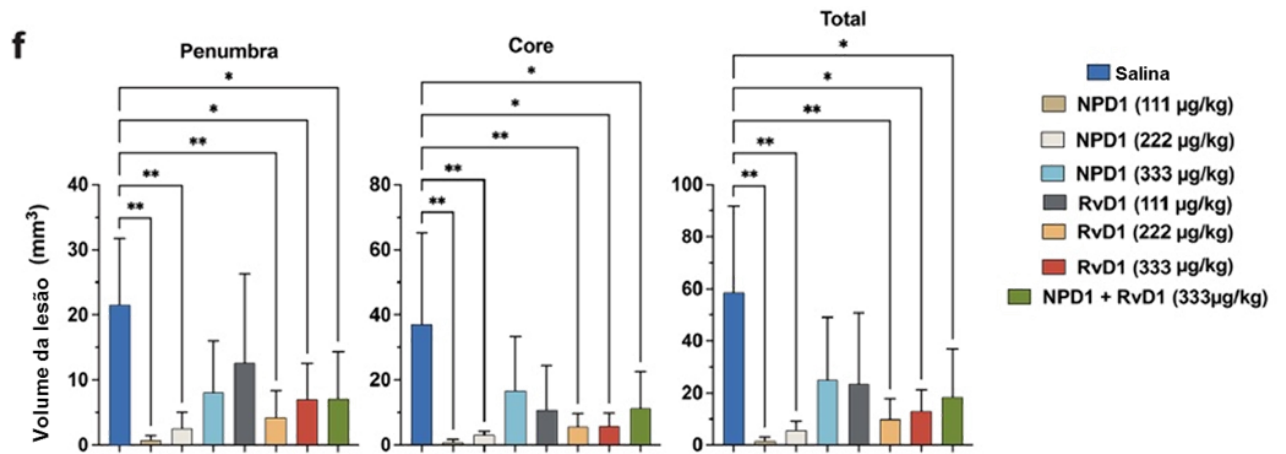
6.3.2 Dose-resposta

O estudo para avaliar a dosagem mais eficaz de NPD1 e RvD1 mostrou melhorias no déficit neurológico em comparação com o veículo para dosagens de NPD1 (111, 222 e 333 µg/kg) e RvD1 (222 e 333 µg/kg), bem como melhorias quando NPD1 + RvD1 foram administrados em combinação (**Figuras 27a–b**). A distribuição da lesão no nível bregma da imagem de ressonância magnética T2WI mostra redução para todos os grupos em comparação com solução salina (**Figuras 27c–e**), e o volume da lesão foi reduzido significativamente por NPD1 (111, 222 e 333 µg/kg), RvD1 (222 e 333 µg/kg) e sua combinação na penumbra isquêmica. A redução do volume da lesão no núcleo isquêmico foi observada apenas por NPD1 e RvD1 (222 µg/kg) (**Figura 27f**).

Figura 27. A dose-resposta mostra que NPD1, RvD1 e sua combinação melhoraram a recuperação funcional após MCAo.



(a-b) Escore neurológico total (normal = 0, déficit máximo = 12) durante 60 min de MCAo e 1, 2, 3 e 7 dias após MCAo. Todos os tratamentos melhoraram os escores neurológicos totais em comparação com o grupo veículo. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média, $n = 8-6$ por grupo. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ versus grupo solução salina (ANOVA de medidas repetidas seguida de testes de Bonferroni). A distribuição de penumbra, núcleo e áreas totais de lesão (c-e).

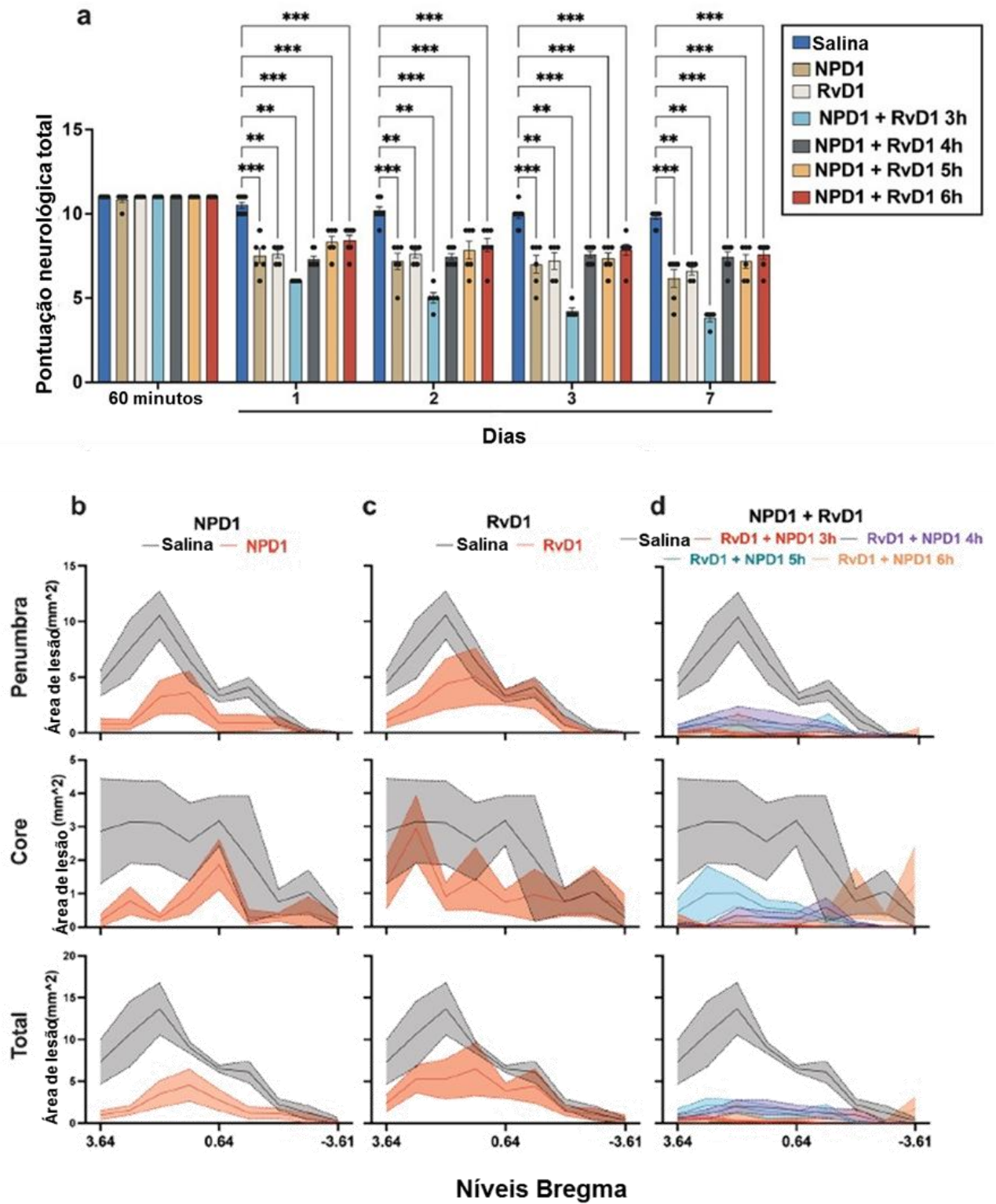


(f) Os volumes foram calculados a partir de T2WI no dia 7. NPD1, RvD1 e sua combinação protegeram o núcleo isquêmico, penumbra, lesão total e volume após o AVC.

6.3.3 Janela Terapêutica

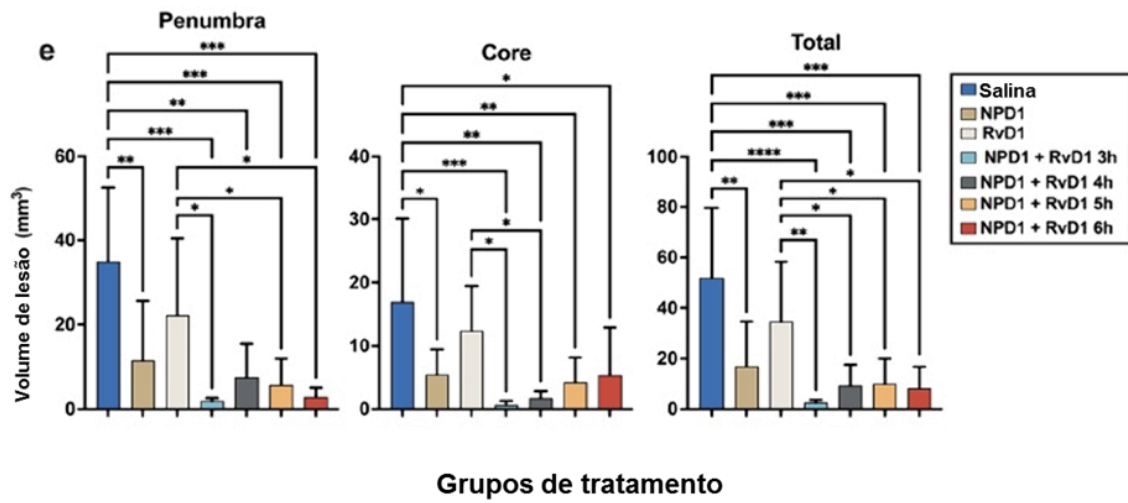
A investigação da janela terapêutica mostrou que o tratamento apenas com NPD1 e RvD1, quando administrado apenas em 3 h, melhorou o escore neurológico total nos dias 1, 2, 3 e 7 em comparação com o veículo (**Figura 28a**). O efeito neuroprotetor foi aumentado pelo tratamento combinatório NPD1 + RvD1, que melhorou o comportamento em 61% quando administrado em 3 h, 26% em 4 h, 25% em 5 h e 31% em 6 h (**Figura 28a**). O tratamento combinado administrado em 3 h foi significativamente melhor do que NPD1 ou RvD1 sozinho em todos os pontos de observação durante o período de sobrevivência de 7 dias (**Figura 13a**). Áreas de penumbra, núcleo e lesão total e volumes calculados a partir de T2WI no dia 7 apresentados nas **Figuras 28b-e**. Núcleo isquêmico, penumbra e áreas totais de lesão foram reduzidos em vários níveis por todos os tratamentos em comparação com solução salina quando administrado até 6 h após o início da MCAo (**Figuras 28b-d**). Em comparação com o grupo salina, o tratamento combinado administrado em 3, 4, 5 e 6 horas reduziu os volumes de lesão na penumbra isquêmica e na lesão total. Os volumes centrais isquêmicos também foram reduzidos pelo tratamento combinado, administrado em 3 e 4 h. O tratamento combinado administrado em três horas foi significativamente melhor do que RvD1 sozinho na redução de penumbra, núcleo e volumes totais no dia 7 (**Figura 28e**). O tratamento combinado administrado em 4 h foi significativamente melhor do que o NPD1 sozinho na redução dos volumes centrais (**Figura 28e**). Embora os volumes das lesões tenham sido reduzidos apenas nos grupos tratados com NPD1 ou RvD1, não houve diferenças estatísticas em comparação com os animais tratados com solução salina (**Figura 28e**).

Figura 28. A janela terapêutica revela que NPD1 (222 μ g/kg), RvD1 (222 μ g/kg) e sua combinação melhoraram os déficits neurológicos quando administrados até 6 h após MCAo.



(a) Escore neurológico total (normal = 0, déficit máximo = 12) durante 60 min de MCAo e 1, 2, 3 e 7 dias após MCAo. Os gráficos mostram melhoria na pontuação neurológica total em todos os grupos tratados *versus* ratos tratados com solução salina. Os dados comportamentais foram representados em médias \pm erro padrão da média; n = 5–6 por grupo. (b–d) A distribuição de penumbra, núcleo e áreas totais de lesão.

NPD1 (222 μ g/kg) e RvD1 (222 μ g/kg).



(e) Os volumes foram calculados a partir de T2WI no dia 7. O tratamento com NPD1 + RvD1 diminuiu o núcleo, a penumbra e as áreas e volumes totais da lesão quando administrado até 6 h após AVC. Os dados foram representados em média \pm erro padrão da média; $n = 5-6$ por grupo, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$ versus grupo solução salina (teste de Mann-Whitney).

7 DISCUSSÃO

Déficits funcionais em roedores após MCAo se assemelham a déficits sensório-motores. O AVC isquêmico focal leva a funções sensório-motoras e cognitivas prejudicadas, com 70 a 80% dos pacientes apresentando hemiparesia após o AVC. Como o objetivo da terapia do AVC é restaurar as funções comportamentais, dois testes da bateria sensório-motora foram usados no presente estudo para detectar déficits neurológicos após o AVC.

Este estudo examinou a eficácia terapêutica de LAU-0901, um antagonista de PAF-R, em combinação com NPD1, AT-NPD1 e DHA após MCAo em ratos. Foi mostrado aqui, pela primeira vez, que o LAU-0901 em combinação com os vários docosanoides reduziu a lesão cerebral isquêmica, promoveu a recuperação funcional e restaurou a via de mediadores lipídicos pró-homeostáticos após AVC isquêmico experimental.

Esses resultados demonstram que o LAU-0901 em combinação com NPD1 e AT-NPD1 reduziu significativamente o volume do infarto e melhorou o escore neurológico quando comparado ao LAU-0901 sozinho. Isso indica a eficácia terapêutica superior do tratamento combinado após AVC isquêmico. LAU-0901 foi usado para inibir a sinalização pró-inflamatória pelo PAF, que se acumula em resposta à lesão celular, incluindo isquemia-reperusão cerebral. Durante a isquemia, o PAF aumenta e então se torna um mensageiro pró-inflamatório, bem como um mediador da neurotoxicidade que leva ao dano neuronal (TIAN; BAZAN, 2005a; BELAYEV *et al.*, 2008). Anteriormente foi mostrado que o LAU-0901 fornece neuroproteção robusta quando usado em AVC isquêmico experimental, reduzindo o volume de infarto cerebral e melhorando os escores neurológicos (BELAYEV *et al.*, 2008).

O NPD1 é um mediador lipídico derivado do DHA, que promove a sobrevivência celular sob estresse oxidativo descompensado, um evento precoce durante a morte celular neuronal (BELAYEV *et al.*, 2017). A lipoxigenação enzimática de DHA no AVC isquêmico experimental resulta na formação de NPD1, que então neutraliza a bioatividade pró-inflamatória e contribui para a neuroproteção sustentada (MARCHESELLI *et al.*, 2003; ASATRYAN; BAZAN, 2017). O NPD1 é protetor após o AVC isquêmico reduzindo o volume do infarto, melhorando o escore neurológico e foi demonstrado seus efeitos para atenuar a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, inibir a indução de isquemia pela ciclooxigenase-2 (COX-2) e ativação do fator nuclear κ B ((MARCHESELLI *et al.*, 2003; EADY *et al.*, 2012; SERHAN *et al.*, 2015). AT-NPD1 é um novo mediador lipídico endógeno derivado do DHA gerado por COX-2 acetilado com aspirina. Quando administrado 3 h após o início do AVC, fornece recuperação neurocomportamental sustentada, reduz infarto e edema

cerebral, melhora a matriz tecidual e protege a substância branca (BAZAN *et al.*, 2012). Ambos os tratamentos combinados com LAU-0901 + NPD1 e LAU-0901 + AT-NPD1 melhoraram a recuperação neurológica do que qualquer um dos tratamentos isoladamente, apoiando a eficácia terapêutica da sua neuroproteção sinérgica. O tratamento combinado com LAU-0901 + DHA e LAU-0901 sozinho provocou um aumento da expressão de prostaglandinas, PGE₂, PGF₂- α , 6-ceto-PGF₁- α e PGD₂, em comparação com animais veículo. As prostaglandinas são lipídios bioativos derivados do metabolismo do ácido araquidônico. Eles sustentam as funções homeostáticas e medeiam os mecanismos patogênicos, incluindo a resposta inflamatória (KENNEDY; STOBO; GOLDYNE, 1980; NOWAK; KAIJSER; WENNMALM, 1980). A expressão aumentada desses metabólitos indica que o tecido manteve sua capacidade de regular o fluxo sanguíneo cerebral e modular o processo inflamatório, que estudos anteriores demonstraram melhorar os resultados funcionais após AVC (SALEEM *et al.*, 2007; RIVA *et al.*, 2012). A isquemia cerebral inicia uma cascata de eventos que estimula a liberação de ácidos graxos livres das membranas celulares, particularmente ácido araquidônico e DHA. Esses mensageiros lipídicos bioativos, por sua vez, dão origem a vários mensageiros lipídicos a jusante, como PAF e eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos). Essas moléculas podem ter efeitos neuroprotetores ou neurodegenerativos no tecido cerebral pós-AVC; portanto, eles contribuem amplamente para o resultado e a recuperação do AVC.

PGE₂, PGF₂- α , 6-ceto-PGF₁- α e PGD₂ exibem bioatividade vasoativa e demonstraram melhorar os resultados pós-AVC. A PGE₂ exerce uma variedade de funções ligando-se principalmente a quatro receptores de membrana conhecidos como E-prostanóide 1, 2, 3 e 4 com efeitos variados fisiologicamente (MCCULLOUGH *et al.*, 2004). Demonstrou-se que o nocaute genético do receptor EP₂ aumenta significativamente o volume da lesão em 24 h em camundongos submetidos à isquemia cerebral, e a ativação desse receptor demonstrou proteger contra lesões excitotóxicas e anóxicas após MCAo (MCCULLOUGH *et al.*, 2004; AHMAD *et al.*, 2010). 6-ceto-PGF₁- α é um metabólito derivado da prostaciclina; foi demonstrado que o direcionamento do receptor prostanóide prostaglandina I₂ após MCAo reduz a lesão isquêmica cerebral e promove a recuperação neurológica de longo prazo após o AVC isquêmico (YANG *et al.*, 2017). A PGD₂ é a prostaglandina mais abundante no cérebro e atua como moduladora do processo neuroinflamatório; esse tipo de prostaglandina atua principalmente nos receptores DP₁, que têm um efeito benéfico nos resultados do AVC quando ativados, minimizando o dano cerebral excitotóxico e isquêmico (SALEEM *et al.*, 2007; AHMAD *et al.*, 2010).

Um aumento na expressão de HODE em ratos tratados com LAU-0901 e LAU-0901 + DHA, bem como uma diminuição na expressão de 12-HETE também foi observado nesse estudo. Acredita-se que o HODE, um derivado do ácido linoleico, esteja envolvido na regulação da neurotransmissão e inflamação em resposta à lesão cerebral, reduzindo a excitotoxicidade do glutamato (VANGAVETI *et al.*, 2016; HENNEBELLE *et al.*, 2017). 12-HETE, um derivado do ácido araquidônico, é um lipídio bioativo formado pela ação da enzima 12-lipoxigenase, que é regulada positivamente em condições de hipóxia. O 12-HETE é um mediador lipídico pró-inflamatório, que pode aumentar o dano isquêmico devido ao aumento da sinalização inflamatória e morte celular. A inibição de 12-HETE demonstrou anteriormente reduzir o tamanho do infarto e melhorar os parâmetros comportamentais (YIGITKANLI *et al.*, 2013). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que o tratamento com LAU-0901 regula a presença de metabólitos que atuam para reduzir a inflamação e o dano neuronal causado pela excitotoxicidade. A presença de marcadores observada em ratos tratados com LAU-0901 e LAU-0901 + DHA é provavelmente o resultado da modulação da perfusão por aumento do fluxo sanguíneo cerebral por meio de prostaglandinas vasoativas, bem como supressão da sinalização pró-inflamatória por meio da diminuição da expressão de 12-HETE e aumento da expressão de HODE, bem como a ação do LAU-0901 inibindo o PAF.

Foi demonstrado também que LAU-0901 e AT-NPD1 melhoram substancialmente a função comportamental e reduzem o volume de infarto cerebral quando administrados prontamente em doses moderadas, potencialmente passíveis de aplicações clínicas; foi mostrado uma ampla janela terapêutica de eficácia neuroprotetora com doses moderadas de LAU-0901 e AT-NPD1. O tratamento iniciado até 6 horas após o início da isquemia do AVC foi altamente eficaz. Achados anteriores que demonstraram a eficácia neuroprotetora de LAU-0901 e AT-NPD1 na isquemia cerebral focal levaram ao avanço desse estudo. Foi descoberto que esses mediadores lipídicos promovem a sobrevivência de células neuronais com importante atividade anti-inflamatória.

Achados anteriores demonstraram a eficácia neuroprotetora de LAU-0901, um antagonista de PAF-R altamente potente e seletivo na isquemia cerebral focal aguda em ratos e camundongos (BELAYEV *et al.*, 2008; BELAYEV *et al.*, 2009). A terapia com LAU-0901 reduziu significativamente os volumes de infarto cortical e subcortical, melhorou os escores comportamentais, atenuou a micróglia infiltração, e promoveu a sobrevivência astrocitária e neuronal quando administrado prontamente após 2 h de MCAo em ratos (BELAYEV *et al.*, 2012). Foi demonstrado que em camundongos tratados com LAU-0901 após uma hora de

MCAo houve o aumento do fluxo sanguíneo cerebral local em 77% da linha de base em 6h em comparação com um fluxo sanguíneo cerebral local de 41% em relação à linha de base observada nos ratos tratados com veículo (BELAYEV *et al.*, 2008). Em um estudo de sobrevivência de longo prazo, 60 mg/kg de LAU-0901, administrado 2 h após o início do derrame em ratos, não apenas produziram melhorias de curto prazo por 7 dias como resultou em efeitos benéficos no resultado comportamental que persistiram até 4 semanas após a MCAo (BELAYEV *et al.*, 2009). Além disso, os animais tratados com LAU-0901 resultaram em um aumento de 20% no tecido cerebral preservado em 30 dias, em uma redução notável na incidência de extensas lesões necróticas císticas e no aumento acentuado de GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e na contagem de células positivas para Nissl (BELAYEV *et al.*, 2009).

Recentemente, relatamos a descoberta do novo AT-NPD1, uma potente molécula anti-inflamatória pró-resolução (SERHAN *et al.*, 2012). O novo produto acionado por aspirina demonstrou ações regulatórias decisivas com leucócitos *in vivo*, redução da migração transendotelial polimorfonuclear humana e aumento da eferocitose (SERHAN *et al.*, 2012). Conforme proposto para outros potentes mediadores locais derivados de ácidos graxos poliinsaturados, a via da protectina desencadeada pela aspirina provavelmente envolve a conversão do hidroperóxido 17R-HpDHA (derivado de DHA contendo 17R-hidroperóxi) em um intermediário epóxido (SERHAN *et al.*, 2012). Essa via desencadeada pela aspirina foi identificada pela primeira vez na fase de resolução da exsudatos inflamatórios e tecidos cerebrais de camundongos tratados com aspirina e sua estrutura básica foi proposta (SERHAN *et al.*, 2002; MARCHESELLI *et al.*, 2003). Foi demonstrado que novos docosanoides inibiram a infiltração de leucócitos mediada por I/R no cérebro e a expressão de genes pró-inflamatórios (MARCHESELLI *et al.*, 2003). Foi identificado uma nova via biossintética que leva à formação de um mediador AT-NPD1 quando aspirina mais DHA são administrados após AVC (BAZAN *et al.*, 2012). Em seguida, foi realizada a síntese química total dessa molécula e a testamos no cenário de 2 h MCAo em ratos. Foi demonstrado que o AT-NPD1 sintético, administrado 3 h após o início do AVC, melhora os escores comportamentais, reduz o infarto cerebral e o edema cerebral, melhora a matriz tecidual e protege a substância branca (BAZAN *et al.*, 2012).

O presente estudo estabeleceu a eficácia para o efeito neuroprotetor de LAU-0901 e AT-NPD1 em um modelo de rato com isquemia cerebral focal. O resultado mais notável foi encontrado em ratos tratados com doses médias e altas de LAU-0901 e AT-NPD1. Todas as doses de LAU-0901 e AT-NPD1 usadas neste estudo foram altamente neuroprotetoras. Os

tratamentos LAU-0901 (60 mg/kg) e AT-NPD1 (222 e 333 µg/kg) sozinhos foram os mais eficazes na melhoria dos escores comportamentais e na redução das lesões cerebrais no sétimo dia após a MCAo. O efeito neuroprotetor foi aprimorado usando o LAU-0901 +AT-NPD1, que melhorou o comportamento durante o período de sobrevivência de 7 dias e reduziu drasticamente os volumes total, central e de penumbra em 93, 94 e 92% em comparação com o grupo veículo. Devido aos desafios de tratar os pacientes a tempo, é necessária uma extensão da janela terapêutica para permitir um apelo mais amplo aos médicos que tratam vítimas de AVC isquêmico. Partindo da pergunta se o LAU-0901 mais AT-NPD1 poderia prolongar a janela terapêutica em um cenário de isquemia cerebral focal. Foi selecionada uma dose no meio da faixa de dose efetiva de AT-NPD1 (222 µg/kg) e LAU-0901 (60 mg/kg) para o estudo de janela terapêutica, que se mostrou eficaz mesmo com um atraso de tratamento de até 6 h. LAU-0901 mais AT-NPD1, quando administrado em 3, 4, 5 e 6 h, melhorou o comportamento em 50, 56, 33 e 26% em comparação com o veículo. O efeito do tratamento combinado foi demonstrado claramente no cortical (região penumbral) e subcortical (núcleo isquêmico) do infarto e reduziu os volumes totais de T2WI em 3 h em 93%, 4 h em 91%, em 5 h em 82% e 6 h em 84% em relação ao veículo. Os mecanismos exatos de LAU-0901 mais AT-NPD1 ainda não foram elucidados, mas especula-se que essa associação provoque a resolução da inflamação e forneçam neuroproteção aditiva em um modelo de AVC experimental.

O efeito benéfico de LAU-0901 e AT-NPD1 foi demonstrado em um modelo animal bem controlado de MCAo (BELAYEV *et al.*, 1996). A oclusão de sutura intraluminal da MCA tornou-se cada vez mais popular como modelo de isquemia focal devido à sua simplicidade e minimamente invasiva. Nesse estudo foi empregada uma sutura revestida com poli-L-lisina e houve a descoberta de que essa técnica produz lesões subcorticais e corticais consistentes (coeficiente de variação do volume do infarto, 9%) (BELAYEV *et al.*, 1996). Esse infarto imita de perto, em extensão e gravidade, os grandes infartos hemisféricos resultante de MCA proximal e oclusão da artéria carótida interna em pacientes. Essencial para a consistência do modelo é o monitoramento rigoroso das variáveis fisiológicas, incluindo a temperatura corporal e craniana. O controle da temperatura craniana é crítico, pois é um determinante essencial da extensão da lesão cerebral. Foi demonstrado que o LAU-0901 e o AT-NPD1 não afetaram diretamente a temperatura do corpo e do cérebro, a pressão arterial e os gases sanguíneos e não produziram nenhum efeito colateral adverso.

Este estudo é o primeiro a avaliar doses eficazes e terapêuticas janelas para tratamento com NPD1 + RvD1 após MCAo em ratos. Foi mostrado que NPD1 + RvD1 melhorou

notavelmente a função neurológica e reduz o volume da lesão no AVC isquêmico agudo quando administrado prontamente em doses moderadas. Também foi demonstrado uma ampla janela terapêutica de neuroproteção com dose moderada (222 µg/kg) de NPD1 + RvD1, de modo que o tratamento iniciado até 6 h após o início do AVC é altamente eficaz. Especula-se que essa associação modula a polarização de M1 ou M2 (aumentando CD163+), ativa genes nos astrócitos neurotóxicos e neuroprotetores, leva ao aumento do gene *Amigo2* que medeia a sinaptogênese e diminui a expressão de TNF α e IL-1 α ; esses fatores podem indicar a inibição desta interação célula-célula para induzir a neuroproteção observada.

Várias terapias experimentais protegem e recuperam tecidos neurais após AVC isquêmico (SAVITZ *et al.*, 2017). No entanto, a persistência de deficiências comportamentais de longo prazo devido a efeitos colaterais graves e janelas de tempo terapêuticas estreitas ainda é uma preocupação (SAVITZ *et al.*, 2017). Nesse estudo foi mostrado que NPD1 ou RvD1 isoladamente e em combinação tiveram um impacto positivo na recuperação funcional de ratos após sete dias de indução com MCAo. Foi selecionada uma dose eficaz (222 µg/kg) para esse estudo de janela terapêutica, que melhorou os escores neurológicos e reduziu acentuadamente os volumes das lesões. O efeito de NPD1 + RvD1 foi demonstrado claramente no núcleo isquêmico e na penumbra quando administrado em 3, 4, 5 e 6 h e reduziu o volume total da lesão T2WI em 95, 82, 81 e 84%, respectivamente, em comparação com o veículo.

A terapia combinada no tratamento do AVC isquêmico é uma abordagem atraente devido à natureza multifacetada da lesão I/R. Assim, uma combinação de neuroprotetores está sendo explorada (CONNELL *et al.*, 2014; CASAS *et al.*, 2019), inclusive promovendo a recuperação neurológica pela remodelação do tecido cerebral (HERMANN; CHOPP, 2012), em ratos tratados com ácido retinoico em enriquecimento ambiental após MCAo, para estimular a neurogênese na zona subventricular e aumentar a sobrevivência neuronal (RODRIGUEZ DE TURCO *et al.*, 2002). A farmacoterapia combinada e a manipulação comportamental aumentam a neurogênese estriatal pós-AVC e diminuem o volume do infarto sem recuperação funcional detectável (RODRIGUEZ DE TURCO *et al.*, 2002). Essa abordagem neurorrestauradora pode não necessariamente exigir uma janela de tempo terapêutico restrita.

Outra estratégia potencial é usar um agente neuroprotetor combinado com trombólise (KNECHT; BORLONGAN; DELA PEÑA, 2018; JIN *et al.*, 2020; BLANCO *et al.*, 2022). t-PA é o único agente trombolítico aprovado para AVC isquêmico agudo e protege o cérebro recanalizando um vaso ocluído e restaurando o fluxo sanguíneo para o cérebro isquêmico,

enquanto os neuroprotetores agem diretamente sobre o cérebro. A terapia combinada pode estender a janela de tempo terapêutico atual do t-PA de 4,5 h e reduzir os efeitos adversos, como hemorragia intracerebral (JIANG *et al.*, 2015; KNECHT; BORLONGAN; DELA PEÑA, 2018). Combinando o tratamento com t-PA mais drogas neuroprotetoras, como antagonistas dos receptores NMDA (LEKIEFFRE *et al.*, 1997), sequestradores de radicais livres (KIMURA *et al.*, 2012), inibidores de metaloprotease de matriz (TAN *et al.*, 2015) e aplicação de sistemas de administração de drogas com nanopartículas (FUKUTA; OKU; KOGURE, 2022) têm efeitos sinérgicos em estudos experimentais. No entanto, as estratégias de combinação ainda precisam ser minuciosamente examinadas clinicamente (ISHRAT *et al.*, 2019).

Esse trabalho mostrou os resultados mais recentes do uso do LAU-0901, NPD1, AT-NPD1 e RvD1, sozinhos ou associados, em modelos de AVC isquêmico cerebral. Foi demonstrada nessas substâncias um potencial farmacológico no tratamento dessa patologia, mas são necessários mais estudos para que seja mais bem elucidado os mecanismos desses docosanoides.

Como limitações pode-se destacar o modelo neurocomportamental aplicado nos animais após a indução da MCAo e o tempo curto de aplicação dele. Também há de ser pontuado que não havia a necessidade de utilização de todas as doses utilizadas, pois foi observado que em doses menores dentro de um mesmo protocolo já havia sido atingido o efeito máximo.

8 CONCLUSÃO

Esses achados revelam um potencial caminho terapêutico a ser explorado para AVC isquêmico e lesões neurológicas. Os mediadores lipídicos selecionados para esse estudo - LAU-0901, NPD1, AT-NPD1 e RvD1 - apresentaram uma eficácia terapêutica que forneceu neuroproteção no cérebro pós-isquêmico, quando administrados isoladamente ou associados.

Essas potenciais terapias promoveram a restauração de mediadores lipídicos pró-homeostáticos com recuperação neurológica melhorada e pode ser uma promessa para o futuro desenvolvimento terapêutico contra o AVC isquêmico.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.S.; AHMAD, M.; MARUYAMA, T.; NARUMIYA, S.; DORÉ, S. Prostaglandin D2 DP1 receptor is beneficial in ischemic stroke and in acute excitotoxicity in young and old mice. **Age (Dordr)**. 2010 Sep;32(3):271-82. doi: 10.1007/s11357-010-9135-y.
- ALEKSIC, D.Z.; JANKOVIC, S.M.; MLOSAVLJEVIC, M.N.; TONCEV, G.L.; MILETIC DRAKULIC, S.D.; STEFANOVIC, S.M. Potential Drug-drug Interactions in Acute Ischemic Stroke Patients at the Neurological Intensive Care Unit. **Open Med (Wars)**. 2019 Nov 7;14:813-826. doi: 10.1515/med-2019-0093.
- ALTMAN, J. Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? **Science**. 1962, 135, 1127–1128. doi:10.1126/science.135.3509.1127
- ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J. Comp. Neurol**. 1965, 124, 319–335. doi:10.1002/cne.901240303
- ALTMAN, J. The Discovery of Adult Mammalian Neurogenesis, in: Seki T, Sawamoto K, Parent JM, Alvarez-Buylla A (Eds.), Neurogenesis in the Adult Brain I. **Springer Japan, Tokyo**. 2011, pp. 3–46. doi:10.1007/978-4-431-53933-9_1
- AMANO, H.; MORIMOTO, K.; SENBA, M.; WANG, H.; ISHIDA, Y.; KUMATORI, A.; YOSHIMINE, H.; OISHI, K.; MUKAIDA, N.; NAGATAKE, T. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. **J Immunol**. 2004 Jan 1;172(1):398-409. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.398.
- AMARENCO, P.; BOGOUSLAVSKY, J.; CAPLAN, L.R.; DONNAN, G.A.; HENNERICI, M.G. Classification of stroke subtypes. **Cerebrovasc Dis**. 2009;27(5):493-501. doi: 10.1159/000210432.
- ANDERSON, R.E.; MAUDE, M.B.; MCCLELLAN, M.; MATTHES, M.T.; YASUMURA, D.; LAVAIL, M.M. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segments of rats with P23H and S334ter rhodopsin mutations. **Mol Vis**. 2002 Sep 23;8:351-8.
- ASATRYAN, A.; BAZAN, N.G. Molecular mechanisms of signaling via the docosanoid neuroprotectin D1 for cellular homeostasis and neuroprotection. **J Biol Chem**. 2017 Jul 28;292(30):12390-12397. doi: 10.1074/jbc.R117.783076.
- ASTRUP, J.; SIESJÖ, B.K.; SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. **Stroke**. 1981 Nov-Dec;12(6):723-5. doi: 10.1161/01.str.12.6.723.
- BANJARA, M.; GHOSH, C. Sterile Neuroinflammation and Strategies for Therapeutic Intervention. **Int J Inflamm**. 2017;2017:8385961. doi: 10.1155/2017/8385961.
- BAZAN, N.G.; BIRKLE, D.L.; REDDY, T.S. Docosahexaenoic acid (22:6, n-3) is metabolized to lipoxygenase reaction products in the retina. **Biochem Biophys Res Commun**. 1984 Dec 14;125(2):741-7. doi: 10.1016/0006-291x(84)90601-6.

BAZAN, N.G. Supply of n-3 polyunsaturated fatty acids and their significance in the central nervous system. **Nutrition and Brain**, v. 8, p. 1-24, 1990.

BAZAN, N.G. Synaptic lipid signaling: Significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. **J Lipid Res.** 2003 Dec;44(12):2221-33. doi: 10.1194/jlr.R300013-JLR200.

BAZAN, N.G. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. **Mol Neurobiol.** 2005a Aug;32(1):89-103. doi: 10.1385/MN:32:1:089.

BAZAN, N.G. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. **Brain Pathol.** 2005b Apr;15(2):159-66. doi: 10.1111/j.1750-3639.2005.tb00513.x.

BAZAN, N.G. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 2007 Mar;10(2):136-41. doi: 10.1097/MCO.0b013e32802b7030.

BAZAN, N.G. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. **J Lipid Res.** 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S400-5. doi: 10.1194/jlr.R800068-JLR200.

BAZAN, N.G.; EADY, T.N.; KHOUTOROVA, L.; ATKINS, K.D.; HONG, S.; LU, Y.; ZHANG, C.; JUN, B.; OBENAU, A.; FREDMAN, G.; ZHU, M.; WINKLER, J.W.; PETASIS, N.A.; SERHAN, C.N.; BELAYEV, L. Novel aspirin-triggered neuroprotectin D1 attenuates cerebral ischemic injury after experimental stroke. **Exp Neurol.** 2012 Jul;236(1):122-30. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.04.007.

BAZAN, N.G. **Research Features**, 2016. A marvellous mind. Disponível em: <<https://researchfeatures.com/marvellous-mind/>>. Acesso em: 12/07/2023.

BELAYEV, L.; ALONSO, O.F.; BUSTO, R.; ZHAO, W.; GINSBERG, M.D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. **Stroke.** 1996 Sep;27(9):1616-22; discussion 1623. doi: 10.1161/01.str.27.9.1616.

BELAYEV, L.; KHOUTOROVA, L.; ATKINS, K.; GORDON, W.C.; ALVAREZ-BUILLA, J.; BAZAN, N.G. LAU-0901, a novel platelet-activating factor antagonist, is highly neuroprotective in cerebral ischemia. **Exp Neurol.** 2008 Dec;214(2):253-8. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.08.009.

BELAYEV, L.; KHOUTOROVA, L.; ATKINS, K.; CHERQUI, A.; ALVAREZ-BUILLA, J.; BAZAN, N.G. LAU-0901, a novel platelet-activating factor receptor antagonist, confers enduring neuroprotection in experimental focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Res.** 2009 Feb 9;1253:184-90. doi: 10.1016/j.brainres.2008.11.074.

BELAYEV, L.; EADY, T.N.; KHOUTOROVA, L.; ATKINS, K.D.; OBENAU, A.; CORDOBA, M.; VAQUERO, J.J.; ALVAREZ-BUILLA, J.; BAZAN, N.G. Superior Neuroprotective Efficacy of LAU-0901, a Novel Platelet-Activating Factor Antagonist, in

Experimental Stroke. **Transl Stroke Res.** 2012 Mar;3(1):154-63. doi: 10.1007/s12975-011-0116-y.

BELAYEV, L.; MUKHERJEE, P.K.; BALASZCZUK, V.; CALANDRIA, J.M.; OBENAU, A.; KHOUTOROVA, L.; HONG, S.H.; BAZAN, N.G. Neuroprotectin D1 upregulates Iduna expression and provides protection in cellular uncompensated oxidative stress and in experimental ischemic stroke. **Cell Death Differ.** 2017 Jun;24(6):1091-1099. doi: 10.1038/cdd.2017.55.

BELAYEV, L.; HONG, S.H.; MENGHANI, H.; MARCELL, S.J.; OBENAU, A.; FREITAS, R.S.; KHOUTOROVA, L.; BALASZCZUK, V.; JUN, B.; ORIÁ, R.B.; BAZAN, N.G. Docosanoids Promote Neurogenesis and Angiogenesis, Blood-Brain Barrier Integrity, Penumbra Protection, and Neurobehavioral Recovery After Experimental Ischemic Stroke. **Mol Neurobiol.** 2018 Aug;55(8):7090-7106. doi: 10.1007/s12035-018-1136-3.

BELAYEV, L.; OBENAU, A.; MUKHERJEE, P.K.; KNOTT, E.J.; KHOUTOROVA, L.; REID, M.M.; ROQUE, C.R.; NGUYEN, L.; LEE, J.B.; PETASIS, N.A.; ORIA, R.B.; BAZAN, N.G. Blocking pro-inflammatory platelet-activating factor receptors and activating cell survival pathways: A novel therapeutic strategy in experimental ischemic stroke. **Brain Circ.** 2020 Dec 29;6(4):260-268. doi: 10.4103/bc.bc_36_20.

BELAYEV, L.; REID, M.M.; BAZAN, N.G. Novel Lipid Mediators as a Promising Therapeutic Strategy for Ischemic Stroke. **Med Res Arch.** 2023 Jan;11(1):10.18103/mra.v11i1.3333. doi: 10.18103/mra.v11i1.3333.

BENJAMIN, E.J.; MUNTNER, P.; ALONSO, A.; BITTENCOURT, M.S.; CALLAWAY, C.W.; CARSON, A.P.; CHAMBERLAIN, A.M.; CHANG, A.R.; CHENG, S.; DAS, S.R.; DELLING, F.N.; DJOUSSE, L.; ELKIND, M.S.V.; FERGUSON, J.F.; FORNAGE, M.; JORDAN, L.C.; KHAN, S.S.; KISSELA, B.M.; KNUTSON, K.L.; KWAN, T.W.; LACKLAND, D.T.; LEWIS, T.T.; LICHTMAN, J.H.; LONGENECKER, C.T.; LOOP, M.S.; LUTSEY, P.L.; MARTIN, S.S.; MATSUSHITA, K.; MORAN, A.E.; MUSSOLINO, M.E.; O'FLAHERTY, M.; PANDEY, A.; PERAK, A.M.; ROSAMOND, W.D.; ROTH, G.A.; SAMPSON, U.K.A.; SATOU, G.M.; SCHROEDER, E.B.; SHAH, S.H.; SPARTANO, N.L.; STOKES, A.; TIRSCHWELL, D.L.; TSAO, C.W.; TURAKHIA, M.P.; VANWAGNER, L.B.; WILKINS, J.T.; WONG, S.S.; VIRANI, S.S.; AMERICAN HEART ASSOCIATION COUNCIL ON EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation.** 2019 Mar 5;139(10):e56-e528. doi: 10.1161/CIR.0000000000000659.

BENN, S.C.; WOOLF, C.J. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. **Nat Rev Neurosci.** 2004 Sep;5(9):686-700. doi: 10.1038/nrn1477.

BERGSMA, D.P.; ELSHOUT, J.A.; VAN DEN BERG, A.V. Segregation of Spontaneous and Training Induced Recovery from Visual Field Defects in Subacute Stroke Patients. **Front Neurol.** 2017 Dec 15;8:681. doi: 10.3389/fneur.2017.00681.

BICKNELL, I.R.; DARROW, R.; BARSALOU, L.; FLIESLER, S.J.; ORGANISCIK, D.T. Alterations in retinal rod outer segment fatty acids and light-damage susceptibility in P23H rats. **Mol Vis.** 2002 Sep 5;8:333-40.

BISICCHIA, E.; SASSO, V.; CATANZARO, G.; LEUTI, A.; BESHARAT, Z.M.; CHIACCHIARINI, M.; MOLINARI, M.; FERRETTI, E.; VISCOMI, M.T.; CHIURCHIÙ, V. Resolvin D1 Halts Remote Neuroinflammation and Improves Functional Recovery after Focal Brain Damage Via ALX/FPR2 Receptor-Regulated MicroRNAs. **Mol Neurobiol.** 2018 Aug;55(8):6894-6905. doi: 10.1007/s12035-018-0889-z.

BLANCO, S.; MARTÍNEZ-LARA, E.; SILES, E.; PEINADO, M.Á. New Strategies for Stroke Therapy: Nanoencapsulated Neuroglobin. **Pharmaceutics.** 2022 Aug 19;14(8):1737. doi: 10.3390/pharmaceutics14081737.

BOEHME, A.K.; ESENWA, C.; ELKIND, M.S. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. **Circ Res.** 2017 Feb 3;120(3):472-495. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308398.

BOETKJAER, A.; BOEDKER, M.; CUI, J.G.; ZHAO, Y.; LUKIW, W.J. Synergism in the repression of COX-2- and TNF α -induction in platelet activating factor-stressed human neural cells. **Neurosci Lett.** 2007 Oct 9;426(1):59-63. doi: 10.1016/j.neulet.2007.08.050.

BOLDRINI, M.; FULMORE, C.A.; TARTT, A.N.; SIMEON, L.R.; PAVLOVA, I.; POPOSKA, V.; ROSOKLIJA, G.B.; STANKOV, A.; ARANGO, V.; DWORK, A.J.; HEN, R.; MANN, J.J. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. **Cell Stem Cell.** 2018, 22, 589–599.e5. doi:10.1016/j.stem.2018.03.015.

BONORA, M.; PATERGNANI, S.; RIMESSI, A.; DE MARCHI, E.; SUSKI, J.M.; BONONI, A.; GIORGI, C.; MARCHI, S.; MISSIROLI, S.; POLETTI, F.; WIECKOWSKI, M.R.; PINTON, P. ATP synthesis and storage. **Purinergic Signal.** 2012 Sep;8(3):343-57. doi: 10.1007/s11302-012-9305-8.

BROUNS, R.; DE DEYN, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg.** 2009 Jul;111(6):483-95. doi: 10.1016/j.clineuro.2009.04.001.

CANUGOVI, C.; MISIAK, M.; FERRARELLI, L.K.; CROTEAU, D.L.; BOHR, V.A. The role of DNA repair in brain related disease pathology. **DNA Repair (Amst).** 2013 Aug;12(8):578-87. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.010.

CASAS, A.I.; HASSAN, A.A.; LARSEN, S.J.; GOMEZ-RANGEL, V.; ELBATREEK, M.; KLEIKERS, P.W.M.; GUNEY, E.; EGEA, J.; LÓPEZ, M.G.; BAUMBACH, J.; SCHMIDT, H.H.H.W. From single drug targets to synergistic network pharmacology in ischemic stroke. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2019 Apr 2;116(14):7129-7136. doi: 10.1073/pnas.1820799116.

CHAMORRO, Á.; MEISEL, A.; PLANAS, A.M.; URRÁ, X.; VAN DE BEEK, D.; VELTKAMP, R. The immunology of acute stroke. **Nat Rev Neurol.** 2012 Jun 5;8(7):401-10. doi: 10.1038/nrneurol.2012.98.

CHAMORRO, Á.; DIRNAGL, U.; URRÁ, X.; PLANAS, A.M. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. **Lancet Neurol.** 2016 Jul;15(8):869-881. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00114-9.

CHE, J.T.; ZHANG, J.T.; QU, Z.W. Protective effect of tetrandrine on neuronal injury in cultured cortical neurons of rats. **Acta Pharmaceutica Sinica**. v. 31, n. 3, p. 161-165, 1996.

CHEN, H.; CEBULA, H.; SCHOTT, R.; DIETEMANN, J.L.; FROELICH, S. Glioblastoma multiforme presenting with ischemic stroke: case report and review of the literature. **J Neuroradiol**. 2011 Dec;38(5):304-7. doi: 10.1016/j.neurad.2011.01.008.

CHENG, Y.; RONG, J. Pro-resolving lipid mediators as therapeutic leads for cardiovascular diseases. **Expert Opin Ther Targets**. 2019 May;23(5):423-436. doi: 10.1080/14728222.2019.1599360.

CHOU, W.C.; HU, L.Y.; HSIUNG, C.N.; SHEN, C.Y. Initiation of the ATM-Chk2 DNA damage response through the base excision repair pathway. **Carcinogenesis**. 2015 Aug;36(8):832-40. doi: 10.1093/carcin/bgv079.

CONNELL, B.J.; SALEH, M.C.; KUCUKKAYA, I.; ABD-EL-AZIZ, A.S.; KHAN, B.V.; SALEH, T.M. UPEI-300, a conjugate of lipoic acid and edaravone, mediates neuroprotection in ischemia/reperfusion. **Neurosci Lett**. 2014 Feb 21;561:151-5. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.060.

CORTINA, M.S.; GORDON, W.C.; LUKIW, W.J.; BAZAN, N.G. Oxidative stress-induced retinal damage up-regulates DNA polymerase gamma and 8-oxoguanine-DNA-glycosylase in photoreceptor synaptic mitochondria. **Exp Eye Res**. 2005 Dec;81(6):742-50. doi: 10.1016/j.exer.2005.04.017.

DALLI, J.; SERHAN, C.N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. **Blood**. 2012 Oct 11;120(15):e60-72. doi: 10.1182/blood-2012-04-423525.

DE AVELDAÑO CALDIRONI, M.I.; BAZAN, N.G. Acyl groups, molecular species, and labeling by ¹⁴C-glycerol and ³H-arachidonic acid of vertebrate retina glycerolipids. Function and Biosynthesis of Lipids. **Boston, MA: Springer US**, 1977. p. 397-404.

DEB, P.; SHARMA, S.; HASSAN, K.M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. **Pathophysiology**. 2010 Jun;17(3):197-218. doi: 10.1016/j.pathophys.2009.12.001.

DE JONG, A.J.; KLOPPENBURG, M.; TOES, R.E.; IOAN-FACSINAY, A. Fatty acids, lipid mediators, and T-cell function. **Front Immunol**. 2014 Oct 13;5:483. doi: 10.3389/fimmu.2014.00483.

DE MEYER, S.F.; DENORME, F.; LANGHAUSER, F.; GEUSS, E.; FLURI, F.; KLEINSCHNITZ, C. Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. **Stroke**. 2016 Apr;47(4):1165-72. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011238.

DELAVARAN, H.; AKED, J.; SJUNNESSON, H.; LINDVALL, O.; NORRVING, B.; KOKAIA, Z.; LINDGREN, A. Spontaneous Recovery of Upper Extremity Motor Impairment After Ischemic Stroke: Implications for Stem Cell-Based Therapeutic Approaches. **Transl Stroke Res**. 2017 Aug;8(4):351-361. doi: 10.1007/s12975-017-0523-9.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.** 1999 Sep;22(9):391-7. doi: 10.1016/s0166-2236(99)01401-0.

DONNAN, G.A.; FISHER, M.; MACLEOD, M.; DAVIS, S.M. Stroke. **Lancet.** 2008 May 10;371(9624):1612-23. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60694-7.

DONKOR, E.S. Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Res Treat.* 2018 Nov 27;2018:3238165. doi: 10.1155/2018/3238165.

DORANS, K.S.; MILLS, K.T.; LIU, Y.; HE, J. Trends in Prevalence and Control of Hypertension According to the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) Guideline. **J Am Heart Assoc.** 2018 Jun 1;7(11):e008888. doi: 10.1161/JAHA.118.008888.

DOYLE, K.P.; SIMON, R.P.; STENZEL-POORE, M.P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology.** 2008 Sep;55(3):310-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.

DUFFIELD, J.S.; FORBES, S.J.; CONSTANDINOU, C.M.; CLAY, S.; PARTOLINA, M.; VUTHOORI, S.; WU, S.; LANG, R.; IREDALE, J.P. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. **J Clin Invest.** 2005 Jan;115(1):56-65. doi: 10.1172/JCI22675.

DUFFIELD, J.S.; HONG, S.; VAIDYA, V.S.; LU, Y.; FREDMAN, G.; SERHAN, C.N.; BONVENTRE, J.V. Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury. **J Immunol.** 2006 Nov 1;177(9):5902-11. doi: 10.4049/jimmunol.177.9.5902.

EADY, T.N.; BELAYEV, L.; KHOUTOROVA, L.; ATKINS, K.D.; ZHANG, C.; BAZAN, N.G. Docosahexaenoic acid signaling modulates cell survival in experimental ischemic stroke penumbra and initiates long-term repair in young and aged rats. **PLoS One.** 2012;7(10):e46151. doi: 10.1371/journal.pone.0046151.

EADY, T.N.; KHOUTOROVA, L.; ANZOLA, D.V.; HONG, S.H.; OBENAU, A.; MOHD-YUSOF, A.; BAZAN, N.G.; BELAYEV, L. Acute treatment with docosahexaenoic acid complexed to albumin reduces injury after a permanent focal cerebral ischemia in rats. **PLoS One.** 2013 Oct 23;8(10):e77237. doi: 10.1371/journal.pone.0077237.

FANG, E.F.; HOU, Y.; PALIKARAS, K.; ADRIAANSE, B.A.; KERR, J.S.; YANG, B.; LAUTRUP, S.; HASAN-OLIVE, M.M.; CAPONIO, D.; DAN, X.; ROCKTÄSCHEL, P.; CROTEAU, D.L.; AKBARI, M.; GREIG, N.H.; FLADBY, T.; NILSEN, H.; CADER, M.Z.; MATTSON, M.P.; TAVERNARAKIS, N.; BOHR, V.A. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. **Nat Neurosci.** 2019 Mar;22(3):401-412. doi: 10.1038/s41593-018-0332-9.

FARACI, F.M. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. **J Appl Physiol.** 2006 Feb;100(2):739-43. doi: 10.1152/jappphysiol.01044.2005.

FAUL, F.; ERDFELDER, E.; LANG, A.G.; BUCHNER, A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behav Res Methods**. 2007 May;39(2):175-91. doi: 10.3758/bf03193146.

FOROUZANFAR, M.H.; LIU, P.; ROTH, G.A.; NG, M.; BIRYUKOV, S.; MARCZAK, L.; ALEXANDER, L.; ESTEP, K.; HASSEN ABATE, K.; AKINYEMIJU, T.F.; ALI, R.; ALVIS-GUZMAN, N.; AZZOPARDI, P.; BANERJEE, A.; BÄRNIGHAUSEN, T.; BASU, A.; BEKELE, T.; BENNETT, D.A.; BIADGILIGN, S.; CATALÁ-LÓPEZ, F.; FEIGIN, V.L.; FERNANDES, J.C.; FISCHER, F.; GEBRU, A.A.; GONA, P.; GUPTA, R.; HANKEY, G.J.; JONAS, J.B.; JUDD, S.E.; KHANG, Y.H.; KHOSRAVI, A.; KIM, Y.J.; KIMOKOTI, R.W.; KOKUBO, Y.; KOLTE, D.; LOPEZ, A.; LOTUFO, P.A.; MALEKZADEH, R.; MELAKU, Y.A.; MENSAH, G.A.; MISGANAW, A.; MOKDAD, A.H.; MORAN, A.E.; NAWAZ, H.; NEAL, B.; NGALESONI, F.N.; OHKUBO, T.; POURMALEK, F.; RAFAY, A.; RAI, R.K.; ROJAS-RUEDA, D.; SAMPSON, U.K.; SANTOS, I.S.; SAWHNEY, M.; SCHUTTE, A.E.; SEPANLOU, S.G.; SHIFA, G.T.; SHIUE, I.; TEDLA, B.A.; THRIFT, A.G.; TONELLI, M.; TRUELSEN, T.; TSILIMPARIS, N.; UKWAJA, K.N.; UTHMAN, O.A.; VASANKARI, T.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; VLASSOV, V.V.; VOS, T.; WESTERMAN, R.; YAN, L.L.; YANO, Y.; YONEMOTO, N.; ZAKI, M.E.; MURRAY, C.J. Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. **JAMA**. 2017 Jan 10;317(2):165-182. doi: 10.1001/jama.2016.19043.

FREITAS, R.S. 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 (doutorado). **Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, Ceará**. 2018.

FUKUTA, T.; OKU, N.; KOGURE, K. Application and Utility of Liposomal Neuroprotective Agents and Biomimetic Nanoparticles for the Treatment of Ischemic Stroke. **Pharmaceutics**. 2022 Feb 4;14(2):361. doi: 10.3390/pharmaceutics14020361.

GIROLAMI, A.; COSI, E.; TASINATO, V.; SANTAROSSA, C.; FERRARI, S.; GIROLAMI, B. Drug-induced thrombophilic or prothrombotic states: an underestimated clinical problem that involves both legal and illegal compounds. **Clin Appl Thromb Hemost**. 2017;23:775–785. doi: 10.1177/1076029616652724.

GONG, X.; SUCHER, N.J. Stroke therapy in traditional Chinese medicine (TCM): prospects for drug discovery and development. **Phytomedicine**. 2002 Jul;9(5):478-84. doi: 10.1078/09447110260571760.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**. 2005 Dec;5(12):953-64. doi: 10.1038/nri1733. PMID: 16322748.

GORELICK, P.B.; WHELTON, P.K.; SOROND, F.; CAREY, R.M. Blood Pressure Management in Stroke. **Hypertension**. 2020 Dec;76(6):1688-1695. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14653. Epub 2020 Oct 12.

GHOSH, N.; YUAN, X.; TURENIUS, C.I.; TONE, B.; AMBADIPUDI, K.; SNYDER, E.Y.; OBENAU, A.; ASHWAL, S. Automated core-penumbra quantification in neonatal ischemic

brain injury. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2012 Dec;32(12):2161-70. doi: 10.1038/jcbfm.2012.121.

GROSSE, G.M.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.J.; TEEBKEN, O.E.; SCHUPPNER, R.; DIRKS, M.; WORTHMANN, H.; LICHTINGHAGEN, R.; MAYE, G.; LIMBOURG, F.P.; WEISSENBORN, K. Monocyte Subsets and Related Chemokines in Carotid Artery Stenosis and Ischemic Stroke. **Int J Mol Sci.** 2016 Mar 23;17(4):433. doi: 10.3390/ijms17040433.

GÜLKE, E; GELDERBLOM, M.; MAGNUS, T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. **Ther Adv Neurol Disord.** 2018 May 22;11:1756286418774254. doi: 10.1177/1756286418774254.

HAGIHARA, H.; MURANO, T.; OHIRA, K.; MIWA, M.; NAKAMURA, K.; MIYAKAWA, T. Expression of progenitor cell/immature neuron markers does not present definitive evidence for adult neurogenesis. **Mol. Brain.** 2019, 12, 1–6. doi:10.1186/s13041-019-0522-8.

HASHIMOTO, D.; CHOW, A.; NOIZAT, C.; TEO, P.; BEASLEY, M.B.; LEBOEUF, M.; BECKER, C.D.; SEE, P.; PRICE, J.; LUCAS, D.; GRETER, M.; MORTHA, A.; BOYER, S.W.; FORSBERG, E.C.; TANAKA, M.; VAN ROOIJEN, N.; GARCÍA-SASTRE, A.; STANLEY, E.R.; GINHOUX, F.; FRENETTE, P.S.; MERAD, M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity.** 2013 Apr 18;38(4):792-804. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004.

HAYANO, M.; YANG, J-H.; BONKOWSKI, M.S.; AMORIM, J.A.; ROSS, J.M.; COPPOTELLI, G.; GRIFFIN, P.; CHEW, Y.C.; GUO, W.; YANG, X.; VERA, D.L.; SALFATI, E.L.; DAS, A.; THAKUR, S.; KANE, A.E.; MITCHELL, S.J.; MOHRI, Y.; NISHIMURA, E.K.; SCHAEVITZ, L.; GARG, N.; BALTA, A-M.; REGO, M.A.; GREGORY-KSANDER, M.; JAKOBS, T.C.; ZHONG, L.; WAKIMOTO, H.; MOSTOSLAVSKY, R.; WAGERS, A.J.; TSUBOTA, K.; BONASERA, S.J.; PALMEIRA, C.M.; SEIDMAN, J.G.; SEIDMAN, C.; WOLF, N.S.; KREILING, J.A.; SEDIVY, J.M.; MURPHY, G.F.; OBERDOERFFER, P.; KSANDER, B.R.; RAJMAN, L.A.; SINCLAIR, D.A. DNA Break-Induced Epigenetic Drift as a Cause of Mammalian Aging. 2019. **SSRN Electron. J.** doi: 10.2139/ssrn.3466338.

HE, J.; BAZAN, H.E. Synergistic effect of platelet-activating factor and tumor necrosis factor-alpha on corneal myofibroblast apoptosis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 2006 Mar;47(3):883-91. doi: 10.1167/iovs.05-0581.

HENNEBELLE, M.; ZHANG, Z.; METHEREL, A.H.; KITSON, A.P.; OTOKI, Y.; RICHARDSON, C.E.; YANG, J.; LEE, K.S.S.; HAMMOCK, B.D.; ZHANG, L.; BAZINET, R.P.; TAHA, A.Y. Linoleic acid participates in the response to ischemic brain injury through oxidized metabolites that regulate neurotransmission. **Sci Rep.** 2017 Jun 28;7(1):4342. doi: 10.1038/s41598-017-02914-7.

HERMANN, D.M.; CHOPP, M. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. **Lancet Neurol.** 2012 Apr;11(4):369-80. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70039-X.

HILL, J.W.; PODDAR, R.; THOMPSON, J.F.; ROSENBERG, G.A.; YANG, Y. Intranuclear matrix metalloproteinases promote DNA damage and apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation in neurons. **Neuroscience**. 2012 Sep 18;220:277-90. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.019.

HONDA, H.M.; KORGE, P.; WEISS, J.N. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. **Ann N Y Acad Sci**. 2005 Jun;1047:248-58. doi: 10.1196/annals.1341.022.

HU, X.; LI, P.; GUO, Y.; WANG, H.; LEAK, R.K.; CHEN, S.; GAO, Y.; CHEN, J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**. 2012 Nov;43(11):3063-70. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659656.

HUG, S.; BERNHARD, S.; STRATMANN, A.E.P.; ERBER, M.; WOHLGEMUTH, L.; KNAPP, C.L.; BAUER, J.M.; VIDONI, L.; FAULER, M.; FÖHR, K.J.; RADERMACHER, P.; HOFFMANN, A.; HUBER-LANG, M.; MESSERER, D.A.C. Activation of Neutrophil Granulocytes by Platelet-Activating Factor Is Impaired During Experimental Sepsis. **Front Immunol**. 2021 Mar 16;12:642867. doi: 10.3389/fimmu.2021.642867.

HUI, C.; TADI, P.; PATTI, L. Ischemic Stroke. 2022 Jun 2. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**; 2023.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat Med**. 2011 Jul 7;17(7):796-808. doi: 10.1038/nm.2399.

ISHRAT, T.; FOUDA, A.Y.; PILLAI, B.; ELDAHSHAN, W.; AHMED, H.; WALLER, J.L.; ERGUL, A.; FAGAN, S.C. Dose-response, therapeutic time-window and tPA-combinatorial efficacy of compound 21: A randomized, blinded preclinical trial in a rat model of thromboembolic stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2019 Aug;39(8):1635-1647. doi: 10.1177/0271678X18764773.

JAIN, V.; LANGHAM, M.C.; WEHRLI, F.W. MRI estimation of global brain oxygen consumption rate. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2010 Sep;30(9):1598-607. doi: 10.1038/jcbfm.2010.49.

JANSSEN, W.J.; BARTHEL, L.; MULDROW, A.; OBERLEY-DEEGAN, R.E.; KEARNS, M.T.; JAKUBZICK, C.; HENSON, P.M. Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**. 2011 Sep 1;184(5):547-60. doi: 10.1164/rccm.201011-1891OC.

JAYARAJ, R.L.; AZIMULLAH, S.; BEIRAM, R.; JALAL, F.Y.; ROSENBERG, G.A. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. **J Neuroinflammation**. 2019 Jul 10;16(1):142. doi: 10.1186/s12974-019-1516-2.

JELINEK, M.; JURAJDA, M.; DURIS, K. Oxidative Stress in the Brain: Basic Concepts and Treatment Strategies in Stroke. **Antioxidants (Basel)**. 2021 Nov 25;10(12):1886. doi: 10.3390/antiox10121886.

JIANG, X.Y.; ZHANG, J.T.; SHI, C.Z. Mechanism of action of ginsenoside Rb1 in decreasing intracellular Ca^{2+} . **Acta Pharmaceutica Sinica**. 1996;31(5):321-6.

JIANG, Y.; FAN, X.; YU, Z.; CHENG, C.; WANG, X.S.; LO, E.H.; SUN, X.; WANG, X. Low dose tPA plus annexin A2 combination attenuates tPA delayed treatment-associated hemorrhage and improves recovery in rat embolic focal stroke. **Neurosci Lett**. 2015 Aug 18;602:73-8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.06.050.

JIANG, X.; ANDJELKOVIC, A.V.; ZHU, L.; YANG, T.; BENNETT, M.V.L.; CHEN, J.; KEEP, R.F.; SHI, Y. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. **Prog Neurobiol**. 2018 Apr-May;163-164:144-171. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.10.001.

JIANG, C.T.; WU, W.F.; DENG, Y.H.; GE, J.W. Modulators of Microglia Activation and Polarization in Ischemic Stroke (Review). **Mol Med Rep**. 2020 May;21(5):2006-2018. doi: 10.3892/mmr.2020.11003.

JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **J Leukoc Biol**. 2010 May;87(5):779-89. doi: 10.1189/jlb.1109766.

JIN, R.; ZHONG, W.; LIU, S.; WANG, M.; LI, G. Inhibition of PI3K γ by AS605240 plus low-dose tissue plasminogen activator (tPA) combination improves thrombolytic therapy in a rat model of embolic stroke. **Neurosci Lett**. 2020 Nov 1;738:135339. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135339.

JOHNSTON, L.K.; RIMS, C.R.; GILL, S.E.; MCGUIRE, J.K.; MANICONE, A.M. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 2012 Oct;47(4):417-26. doi: 10.1165/rcmb.2012-0090OC.

KATAN, M.; LUFT, A. Global Burden of Stroke. **Semin Neurol**. 2018 Apr;38(2):208-211. doi: 10.1055/s-0038-1649503.

KATO, K.; CLARK, G.D.; BAZAN, N.G.; ZORUMSKI, C.F. Platelet-activating factor as a potential retrograde messenger in CA1 hippocampal long-term potentiation. **Nature**. 1994 Jan 13;367(6459):175-9. doi: 10.1038/367175a0.

KEARNS, M.T.; BARTHEL, L.; BEDNAREK, J.M.; YUNT, Z.X.; HENSON, P.M.; JANSSEN, W.J. Fas ligand-expressing lymphocytes enhance alveolar macrophage apoptosis in the resolution of acute pulmonary inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2014 Jul 1;307(1):L62-70. doi: 10.1152/ajplung.00273.2013.

KENNEDY, M.S.; STOBO, J.D.; GOLDYNE, M.E. In vitro synthesis of prostaglandins and related lipids by populations of human peripheral blood mononuclear cells. **Prostaglandins**. 1980 Jul;20(1):135-45. doi: 10.1016/0090-6980(80)90013-1.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. 1972 Aug;26(4):239-57. doi: 10.1038/bjc.1972.33.

KIM, H.Y.; AKBAR, M.; LAU, A.; EDSALL, L. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. **J Biol Chem**. 2000 Nov 10;275(45):35215-23. doi: 10.1074/jbc.M004446200.

- KIMURA, K.; AOKI, J.; SAKAMOTO, Y.; KOBAYASHI, K.; SAKAI, K.; INOUE, T.; IGUCHI, Y.; SHIBAZAKI, K. Administration of edaravone, a free radical scavenger, during t-PA infusion can enhance early recanalization in acute stroke patients--a preliminary study. **J Neurol Sci.** 2012 Feb 15;313(1-2):132-6. doi: 10.1016/j.jns.2011.09.006.
- KLOSKA, S.P.; WINTERMARK, M.; ENGELHORN, T.; FIEBACH, J.B. Acute stroke magnetic resonance imaging: current status and future perspective. **Neuroradiology.** 2010 Mar;52(3):189-201. doi: 10.1007/s00234-009-0637-1.
- KNECHT, T.; BORLONGAN, C.; DELA PEÑA, I. Combination therapy for ischemic stroke: Novel approaches to lengthen therapeutic window of tissue plasminogen activator. **Brain Circ.** 2018 Jul-Sep;4(3):99-108. doi: 10.4103/bc.bc_21_18.
- KRISHNAMOORTHY, S.; RECCHIUTI, A.; CHIANG, N.; YACOUBIAN, S.; LEE, C.H.; YANG, R.; PETASIS, N.A.; SERHAN, C.N. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2010 Jan 26;107(4):1660-5. doi: 10.1073/pnas.0907342107.
- KUSAKABE, M.; ONISHI, Y.; TADA, H.; KURIHARA, F.; KUSAO, K.; FURUKAWA, M.; IWAI, S.; YOKOI, M.; SAKAI, W.; SUGASAWA, K. Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. **Genes Environ.** 2019 Jan 25;41:2. doi: 10.1186/s41021-019-0119-6.
- LAMBERTSEN, K.L.; FINSEN, B.; CLAUSEN, B.H. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? **Acta Neuropathol.** 2019 May;137(5):693-714. doi: 10.1007/s00401-018-1930-z.
- LEKIEFFRE, D.; BENAVIDES, J.; SCATTON, B.; NOWICKI, J.P. Neuroprotection afforded by a combination of eliprodil and a thrombolytic agent, rt-PA, in a rat thromboembolic stroke model. **Brain Res.** 1997 Nov 21;776(1-2):88-95. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00992-x.
- LENG, T.; SHI, Y.; XIONG, Z.G.; SUN, D. Proton-sensitive cation channels and ion exchangers in ischemic brain injury: new therapeutic targets for stroke? **Prog Neurobiol.** 2014 Apr;115:189-209. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.12.008.
- LI, J.Q.; ZHANG, X.G.; ZHANG, J.T. Study on the anti-apoptotic mechanism of ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons. **Acta Pharmaceutica Sinica.** 1997, 32, 406–410.
- LI, P.; STETLER, R.A.; LEAK, R.K.; SHI, Y.; LI, Y.; YU, W.; BENNETT, M.V.L.; CHEN, J. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. **Neuropharmacology.** 2018 May 15;134(Pt B):208-217. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.011.
- LI, Y.; XIE, L.; HUANG, T.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; QI, B.; WANG, X.; CHEN, Z.; LI, P. Aging Neurovascular Unit and Potential Role of DNA Damage and Repair in Combating Vascular and Neurodegenerative Disorders. **Front Neurosci.** 2019 Aug 8;13:778. doi: 10.3389/fnins.2019.00778.

LINNIK, M.D.; ZOBRIST, R.H.; HATFIELD, M.D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**. 1993 Dec;24(12):2002-8; discussion 2008-9. doi: 10.1161/01.str.24.12.2002.

LITMAN, B.J.; NIU, S.L.; POLOZOVA, A.; MITCHELL, D.C. The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction. **J Mol Neurosci**. 2001 Apr-Jun;16(2-3):237-42; discussion 279-84. doi: 10.1385/JMN:16:2-3:237.

LIU, J.; LI, R.; LIU, G.; WANG, J. Protective effects of (-)-SR-daurisoline on neuronal injury in rat primary cortical cultures. **Acta Pharmaceutica Sinica**. v. 33, n. 3, p. 171-174, 1998.

LIU, Y.; SHIELDS, L.B.E.; GAO, Z.; WANG, Y.; ZHANG, Y.P.; CHU, T.; ZHU, Q.; SHIELDS, C.B.; CAI, J. Current Understanding of Platelet-Activating Factor Signaling in Central Nervous System Diseases. **Mol Neurobiol**. 2017 Sep;54(7):5563-5572. doi: 10.1007/s12035-016-0062-5.

LOBO, P.G.G.A.; ZANON, V.B.; DE LARA, D.; FREIRE, V.B.; NOZAWA, C.A.; DE ANDRADE, J.V.B.; BARROS, W.C.; LOBO, I.G.A. Epidemiologia do acidente vascular cerebral isquêmico no Brasil no ano de 2019, uma análise sob a perspectiva da faixa etária. **Brazilian Journal of Health Review**. 2021, 4(1), 3498–3505. doi: 10.34119/bjhrv4n1-272.

MA, Y.; WANG, J.; WANG, Y.; YANG, G.Y. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. **Prog Neurobiol**. 2017 Oct;157:247-272. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.01.005.

MACMANUS, J.P.; BUCHAN, A.M.; HILL, I.E.; RASQUINHA, I.; PRESTON, E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. **Neurosci Lett**. 1993 Dec 24;164(1-2):89-92. doi: 10.1016/0304-3940(93)90864-h.

MANGANAS LN, ZHANG X, LI Y, HAZEL RD, SMITH SD, WAGSHUL ME, HENN F, BENVENISTE H, DJURIC PM, ENIKOLOPOV G, MALETIC-SAVATIC M. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. **Science**. 2007, 318, 980–5. doi:10.1126/science.1147851.

MARCHESELLI, V.L.; HONG, S.; LUKIW, W.J.; TIAN, X.H.; GRONERT, K.; MUSTO, A.; HARDY, M.; GIMENEZ, J.M.; CHIANG, N.; SERHAN, C.N.; BAZAN, N.G. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. **J Biol Chem**. 2003 Oct 31;278(44):43807-17. doi: 10.1074/jbc.M305841200.

MARÍN-PRIDA, J.; PAVÓN-FUENTES, N.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; FERNÁNDEZ-MASSÓ, J.R.; DELGADO-ROCHE, L.; MENDOZA-MARÍ, Y.; SANTANA, S.P.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; VALENZUELA-SILVA, C.; NAZÁBAL-GÁLVEZ, M.; CINTADO-BENÍTEZ, A.; PARDO-ANDREU, G.L.; POLENTARUTTI, N.; RIVA, F.; PENTÓN-ARIAS, E.; PENTÓN-ROL, G. Phycocyanobilin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute cerebral hypoperfusion in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2013 Oct 1;272(1):49-60. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.021.

MARTIN-VILLALBA, A.; HERR, I.; JEREMIAS, I.; HAHNE, M.; BRANDT, R.; VOGEL, J.; SCHENKEL, J.; HERDEGEN, T.; DEBATIN, K.M. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. **J Neurosci**. 1999 May 15;19(10):3809-17. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-10-03809.1999.

MARTINEZ-CORIA, H.; ARRIETA-CRUZ, I.; CRUZ, M.E.; LÓPEZ-VALDÉS, H.E. Physiopathology of ischemic stroke and its modulation using memantine: evidence from preclinical stroke. **Neural Regen Res**. 2021 Mar;16(3):433-439. doi: 10.4103/1673-5374.293129.

MATUR, A.V.; CANDELARIO-JALIL, E.; PAUL, S.; KARAMYAN, V.T.; LEE, J.D.; PENNYPACKER, K.; FRASER, J.F. Translating Animal Models of Ischemic Stroke to the Human Condition. **Transl Stroke Res**. 2022 Sep 20. doi: 10.1007/s12975-022-01082-9.

MCCULLOUGH, L.; WU, L.; HAUGHEY, N.; LIANG, X.; HAND, T.; WANG, Q.; BREYER, R.M.; ANDREASSON, K. Neuroprotective function of the PGE₂ EP₂ receptor in cerebral ischemia. **J Neurosci**. 2004 Jan 7;24(1):257-68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4485-03.2004.

MIAO, Z.; SCHULTZBERG, M.; WANG, X.; ZHAO, Y. Role of polyunsaturated fatty acids in ischemic stroke - A perspective of specialized pro-resolving mediators. **Clin Nutr**. 2021 May;40(5):2974-2987. doi: 10.1016/j.clnu.2020.12.037.

MINNERUP, J.; SUTHERLAND, B.A.; BUCHAN, A.M.; KLEINSCHNITZ, C. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. **Int J Mol Sci**. 2012;13(9):11753-11772. doi: 10.3390/ijms130911753.

MOOKERJEE, S.A.; GERENCSEI, A.A.; NICHOLLS, D.G.; BRAND, M.D. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. **J Biol Chem**. 2017 Apr 28;292(17):7189-7207. doi: 10.1074/jbc.M116.774471.

MORENO-JIMÉNEZ, E.P.; FLOR-GARCÍA, M.; TERREROS-RONCAL, J.; RÁBANO, A.; CAFINI, F.; PALLAS-BAZARRA, N.; ÁVILA, J.; LLORENS-MARTÍN, M. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. **Nat Med**. 2019 Apr;25(4):554-560. doi: 10.1038/s41591-019-0375-9.

MORIGUCHI, T.; SALEM, N.JR. Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. **J Neurochem**. 2003 Oct;87(2):297-309. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01966.x.

MORITA-FUJIMURA, Y.; FUJIMURA, M.; YOSHIMOTO, T.; CHAN, P.H. Superoxide during reperfusion contributes to caspase-8 expression and apoptosis after transient focal stroke. **Stroke**. 2001 Oct;32(10):2356-61. doi: 10.1161/hs1001.097241.

MOUMEN, A.; MAGILL, C.; DRY, K.L.; JACKSON, S.P. ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage. **Cell Cycle**. 2013 Feb 15;12(4):698-704. doi: 10.4161/cc.23592.

MUHAMMAD, I.F.; BORNÉ, Y.; MELANDER, O.; ORHO-MELANDER, M.; NILSSON, J.; SÖDERHOLM, M.; ENGSTRÖM, G. FADD (Fas-Associated Protein With Death Domain), Caspase-3, and Caspase-8 and Incidence of Ischemic Stroke. **Stroke**. 2018 Sep;49(9):2224-2226. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.022063.

MUKHERJEE, P.K.; MARCHESELLI, V.L.; SERHAN, C.N.; BAZAN, N.G. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004 Jun 1;101(22):8491-6. doi: 10.1073/pnas.0402531101.

NELSON, C.W.; WEI, E.P.; POVLISHOCK, J.T.; KONTOS, H.A.; MOSKOWITZ, M.A. Oxygen radicals in cerebral ischemia. **Am J Physiol**. 1992 Nov;263(5 Pt 2):H1356-62. doi: 10.1152/ajpheart.1992.263.5.H1356.

NEURINGER, M.; CONNOR, W.E.; VAN PETTEN, C.; BARSTAD, L. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys. **J Clin Invest**. 1984 Jan;73(1):272-6. doi: 10.1172/JCI111202.

NOWAK, J.; KAIJSER, L.; WENNMALM, A. Cardiac synthesis of prostaglandins from arachidonic acid in man. **Prostaglandins Med**. 1980 Apr;4(4):205-14. doi: 10.1016/0161-4630(80)90015-4.

O'DONNELL, M.J.; CHIN, S.L.; RANGARAJAN, S.; XAVIER, D.; LIU, L.; ZHANG, H.; RAO-MELACINI, P.; ZHANG, X.; PAIS, P.; AGAPAY, S.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; DAMASCENO, A.; LANGHORNE, P.; MCQUEEN, M.J.; ROSENGREN, A.; DEHGHAN, M.; HANKEY, G.J.; DANS, A.L.; ELSAYED, A.; AVEZUM, A.; MONDO, C.; DIENER, H.C.; RYGLEWICZ, D.; CZLONKOWSKA, A.; POGOSOVA, N.; WEIMAR, C.; IQBAL, R.; DIAZ, R.; YUSOFF, K.; YUSUFALI, A.; OGUZ, A.; WANG, X.; PENAHERRERA, E.; LANAS, F.; OGAH, O.S.; OGUNNIYI, A.; IVERSEN, H.K.; MALAGA, G.; RUMBOLDT, Z.; OVEISGHARAN, S.; AL HUSSAIN, F.; MAGAZI, D.; NILANONT, Y.; FERGUSON, J.; PARE, G.; YUSUF, S.; INTERSTROKE INVESTIGATORS. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. **Lancet**. 2016 Aug 20;388(10046):761-75. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30506-2.

OSTERMANN, A.I.; WEST, A.L.; SCHOENFELD, K.; BROWNING, L.M.; WALKER, C.G.; JEBB, S.A.; CALDER, P.C.; SCHEBB, N.H. Plasma oxylipins respond in a linear dose-response manner with increased intake of EPA and DHA: results from a randomized controlled trial in healthy humans. **Am J Clin Nutr**. 2019 May 1;109(5):1251-1263. doi: 10.1093/ajcn/nqz016.

PAPASILEKAS, T.; THEMISTOKLIS, K.M.; MELANIS, K.; PATRIKELIS, P.; SPARTALIS, E.; KORFIAS, S.; SAKAS, D. A Brief Review of Brain's Blood Flow-Metabolism Coupling and Pressure Autoregulation. **J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg**. 2021 May;82(3):257-261. doi: 10.1055/s-0040-1721682.

PAUL, S.; CANDELARIO-JALIL, E. Emerging Neuroprotective Strategies for the Treatment of Ischemic Stroke: An Overview of Clinical and Preclinical Studies. **Exp Neurol**. 2021 Jan;335:113518. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113518.

PLESNILA, N.; ZINKEL, S.; LE, D.A.; AMIN-HANJANI, S.; WU, Y.; QIU, J.; CHIARUGI, A.; THOMAS, S.S.; KOHANE, D.S.; KORSMEYER, S.J.; MOSKOWITZ, M.A. BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001 Dec 18;98(26):15318-23. doi: 10.1073/pnas.261323298.

PULSINELLI, W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. **Lancet**. 1992 Feb 29;339(8792):533-6. doi: 10.1016/0140-6736(92)90347-6.

RADAK, D.; KATSIKI, N.; RESANOVIC, I.; JOVANOVIĆ, A.; SUDAR-MILOVANOVIĆ, E.; ZAFIROVIĆ, S.; MOUSAD, S.A.; ISENOVIĆ, E.R. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. **Curr Vasc Pharmacol**. 2017;15(2):115-122. doi: 10.2174/1570161115666161104095522.

RAKIC, P. Limits of neurogenesis in primates. *Science*. 1985, 227, 1054–1056. doi:10.1126/science.3975601.

RAMM P, COUILLARD-DESPRES S, PLÖTZ S, RIVERA FJ, KRAMPERT M, LEHNER B, KREMER W, BOGDAHN U, KALBITZER HR, AIGNER L. A nuclear magnetic resonance biomarker for neural progenitor cells: is it all neurogenesis? **Stem Cells**. 2009, 27, 420–3. doi:10.1634/stemcells.2008-0816.

RAMOS-CABRER, P.; CAMPOS, F.; SOBRINO, T.; CASTILLO, J. Targeting the ischemic penumbra. **Stroke**. 2011 Jan;42(1 Suppl):S7-11. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596684.

RANI, V.; DEEP, G.; SINGH, R.K.; PALLE, K.; YADAV, U.C. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sci**. 2016 Mar 1;148:183-93. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.002.

RECCHIUTI, A.; SERHAN, C.N. Pro-Resolving Lipid Mediators (SPMs) and Their Actions in Regulating miRNA in Novel Resolution Circuits in Inflammation. **Front Immunol**. 2012 Oct 22;3:298. doi: 10.3389/fimmu.2012.00298.

RIVA, M.; PAPPADÀ, G.B.; PAPADAKIS, M.; CUCCIONE, E.; CARONE, D.; MENENDEZ, V.R.; SGANZERLA, E.P.; BERETTA, S. Hemodynamic monitoring of intracranial collateral flow predicts tissue and functional outcome in experimental ischemic stroke. **Exp Neurol**. 2012 Feb;233(2):815-20. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.12.006.

ROBERTS, L.J.^{2ND}; MONTINE, T.J.; MARKESBERY, W.R.; TAPPER, A.R.; HARDY, P.; CHEMTOB, S.; DETTBARN, W.D.; MORROW, J.D. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. **J Biol Chem**. 1998 May 29;273(22):13605-12. doi: 10.1074/jbc.273.22.13605.

RODRIGUEZ DE TURCO, E.B.; BELAYEV, L.; LIU, Y.; BUSTO, R.; PARKINS, N.; BAZAN, N.G.; GINSBERG, M.D. Systemic fatty acid responses to transient focal cerebral ischemia: influence of neuroprotectant therapy with human albumin. **J Neurochem**. 2002 Nov;83(3):515-24. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01121.x

SAKLANI, P.; KHAN, H.; GUPTA, S.; KAUR, A.; SINGH, T.G. Neuropeptides: Potential neuroprotective agents in ischemic injury. **Life Sci.** 2022 Jan 1;288:120186. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120186.

SALEEM, S.; ZHUANG, H.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; MARUYAMA, T.; NARUMIYA, S.; DORÉ, S. PGD(2) DP1 receptor protects brain from ischemia-reperfusion injury. **Eur J Neurosci.** 2007 Jul;26(1):73-8. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05627.x.

SALEH, M.C.; CONNELL, B.J.; RAJAGOPAL, D.; KHAN, B.V.; ABD-EL-AZIZ, A.S.; KUCUKKAYA, I.; SALEH, T.M. Co-Administration of Resveratrol and Lipoic Acid, or Their Synthetic Combination, Enhances Neuroprotection in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion. **PLoS ONE.** 2014. 9(1): e87865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087865>.

SAMARY, C.S.; RAMOS, A.B.; MAIA, L.A.; ROCHA, N.N.; SANTOS, C.L.; MAGALHÃES, R.F.; CLEVELARIO, A.L.; PIMENTEL-COELHO, P.M.; MENDEZ-OTERO, R.; CRUZ, F.F.; CAPELOZZI, V.L.; FERREIRA, T.P.T.; KOCH, T.; DE ABREU, M.G.; DOS SANTOS, C.C.; PELOSI, P.; SILVA, P.L.; ROCCO, P.R.M. Focal ischemic stroke leads to lung injury and reduces alveolar macrophage phagocytic capability in rats. **Crit Care.** 2018 Oct 5;22(1):249. doi: 10.1186/s13054-018-2164-0.

SAMUELSSON, B. Les Prix Nobel: Nobel Prizes, Presentations, Biographies and Lectures. **Almqvist & Wiksell**; Stockholm: 1982. From studies of biochemical mechanisms to novel biological mediators: prostaglandin endoperoxides, thromboxanes and leukotrienes; pp. 153–174.

SARFO, F.S.; ULASAVETS, U.; OPARE-SEM, O.K.; OVBIAGELE, B. Tele-Rehabilitation after Stroke: An Updated Systematic Review of the Literature. **J Stroke Cerebrovasc Dis.** 2018 Sep;27(9):2306-2318. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.013.

SAVITZ, S.I.; BARON, J.C.; YENARI, M.A.; SANOSSIAN, N.; FISHER, M. Reconsidering Neuroprotection in the Reperfusion Era. **Stroke.** 2017 Dec;48(12):3413-3419. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017283.

SCHEINBERG, P. Survival of the ischemic brain: a progress report. **Circulation.** 1979 Dec;60(7):1600-5. doi: 10.1161/01.cir.60.7.1600.

SCHULTZ, M.B.; SINCLAIR, D.A. When stem cells grow old: Phenotypes and mechanisms of stem cell aging. **Dev.** 2016, 143, 3–14. doi:10.1242/dev.130633.

SCHWAB, J.M.; CHIANG, N.; ARITA, M.; SERHAN, C.N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature.** 2007 Jun 14;447(7146):869-74. doi: 10.1038/nature05877.

SERHAN, C.N.; HONG, S.; GRONERT, K.; COLGAN, S.P.; DEVCHAND, P.R.; MIRICK, G.; MOUSSIGNAC, R.L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **J Exp Med.** 2002 Oct 21;196(8):1025-37. doi: 10.1084/jem.20020760.

SERHAN, C.N.; ARITA, M.; HONG, S.; GOTTLINGER, K. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. **Lipids**. 2004 Nov;39(11):1125-32. doi: 10.1007/s11745-004-1339-7.

SERHAN, C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**. 2007;25:101-37. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647.

SERHAN, C.N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. **Annu Rev Pathol**. 2008;3:279-312. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409.

SERHAN, C.N.; FREDMAN, G.; YANG, R.; KARAMNOV, S.; BELAYEV, L.S.; BAZAN, N.G.; ZHU, M.; WINKLER, J.W.; PETASIS, N.A. Novel proresolving aspirin-triggered DHA pathway. **Chem Biol**. 2011 Aug 26;18(8):976-87. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.06.008.

SERHAN, C.N.; DALLI, J.; COLAS, R.A.; WINKLER, J.W.; CHIANG, N. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. **Biochim Biophys Acta**. 2015 Apr;1851(4):397-413. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.08.006.

SERHAN, C.N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. **FASEB J**. 2017 Apr;31(4):1273-1288. doi: 10.1096/fj.201601222R.

SHRUSTER, A.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Neurogenesis in the aged and neurodegenerative brain. **Apoptosis**. 2010 Nov;15(11):1415-21. doi: 10.1007/s10495-010-0491-y.

SHYU, H.Y.; SHIEH, J.C.; JI-HO, L.; WANG, H.W.; CHENG, C.W. Polymorphisms of DNA repair pathway genes and cigarette smoking in relation to susceptibility to large artery atherosclerotic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. **J Atheroscler Thromb**. 2012;19(4):316-25. doi: 10.5551/jat.10967.

SORRELLS, S.F.; PAREDES, M.F.; CEBRIAN-SILLA, A.; SANDOVAL, K.; QI, D.; KELLEY, K.W.; JAMES, D.; MAYER, S.; CHANG, J.; AUGUSTE, K.I.; CHANG, E.F.; GUTIERREZ, A.J.; KRIEGSTEIN, A.R.; MATHERN, G.W.; OLDHAM, M.C.; HUANG, E.J.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; YANG, Z.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. **Nature**. 2018, 555, 377–381. doi:10.1038/nature25975.

SOUZA, D.G.; PINHO, V.; PESQUERO, J.L.; LOMEZ, E.S.; POOLE, S.; JULIANO, L.; CORREA, A.JR.; DE A CASTRO, M.S.; TEIXEIRA, M.M. Role of the bradykinin B2 receptor for the local and systemic inflammatory response that follows severe reperfusion injury. **Br J Pharmacol**. 2003 May;139(1):129-39. doi: 10.1038/sj.bjp.0705200.

SPITE, M.; SERHAN, C.N. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. **Circ Res**. 2010 Nov 12;107(10):1170-84. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223883.

SUN, G.Y.; XU, J.; JENSEN, M.D.; SIMONYI, A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. **J Lipid Res.** 2004 Feb;45(2):205-13. doi: 10.1194/jlr.R300016-JLR200.

SUN, G.Y.; HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, A.A. The roles of NADPH oxidase and phospholipases A2 in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases. **J Neurochem.** 2007 Oct;103(1):1-16. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04670.x.

SUN, Y.P.; OH, S.F.; UDDIN, J.; YANG, R.; GOTTLINGER, K.; CAMPBELL, E.; COLGAN, S.P.; PETASIS, N.A.; SERHAN, C.N. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. **J Biol Chem.** 2007 Mar 30;282(13):9323-9334. doi: 10.1074/jbc.M609212200.

SUN, M.S.; JIN, H.; SUN, X.; HUANG, S.; ZHANG, F.L.; GUO, Z.N.; YANG, Y. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. **Oxid Med Cell Longev.** 2018 Jan 31;2018:3804979. doi: 10.1155/2018/3804979.

TAN, Z.; LUCKE-WOLD, B.P.; LOGSDON, A.F.; TURNER, R.C.; TAN, C.; LI, X.; HONGPAISON, J.; ALKON, D.L.; SIMPKINS, J.W.; ROSEN, C.L.; HUBER, J.D. Bryostatin extends tPA time window to 6 h following middle cerebral artery occlusion in aged female rats. **Eur J Pharmacol.** 2015 Oct 5;764:404-412. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.07.035.

THANNICKAL, V.J.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2000 Dec;279(6):L1005-28. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005.

TIAN, X.; BAZAN, N.G. Neuroprotection by platelet-activating factor antagonism. **Ann N Y Acad Sci.** 2005 Aug;1053:455-6. doi: 10.1111/j.1749-6632.2005.tb00054.x.

TOOMEY, C.E.; HEYWOOD, W.E.; EVANS, J.R.; LACHICA, J.; PRESSEY, S.N.; FOTI, S.C.; AL SHAHRANI, M.; D'SA, K.; HARGREAVES, I.P.; HEALES, S.; ORFORD, M.; TROAKES, C.; ATTEMS, J.; GELPI, E.; PALKOVITS, M.; LASHLEY, T.; GENTLEMAN, S.M.; REVESZ, T.; MILLS, K.; GANDHI, S. Mitochondrial dysfunction is a key pathological driver of early stage Parkinson's. **Acta Neuropathol Commun.** 2022 Sep 8;10(1):134. doi: 10.1186/s40478-022-01424-6.

TOSCANO, E.C.; SILVA, B.C.; VICTORIA, E.C.; CARDOSO, A.C.; MIRANDA, A.S.; SUGIMOTO, M.A.; SOUSA, L.P.; CARVALHO, B.A.; KANGUSSU, L.M.; SILVA, D.G.; RODRIGUES, F.G.; BARCELOS LDA, S.; VASCONCELOS, A.C.; AMARAL, F.A.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L.; RACHID, M.A. Platelet-activating factor receptor (PAFR) plays a crucial role in experimental global cerebral ischemia and reperfusion. **Brain Res Bull.** 2016 Jun;124:55-61. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.03.022.

TUO, Q.Z.; ZHANG, S.T.; LEI, P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. **Med Res Rev.** 2022 Jan;42(1):259-305. doi: 10.1002/med.21817.

VANDER HEIDEN, M.G.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**. 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.

VANGAVETI, V.N.; JANSEN, H.; KENNEDY, R.L.; MALABU, U.H. Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer. **Eur J Pharmacol**. 2016 Aug 15;785:70-76. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.096.

VAN LEYEN, K.; KIM, H.Y.; LEE, S.R.; JIN, G.; ARAI, K.; LO, E.H. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. **Stroke**. 2006 Dec;37(12):3014-8. doi: 10.1161/01.STR.0000249004.25444.a5.

VELIER, J.J.; ELLISON, J.; KIKLY, K.K.; SPERA, P.A.; BARONE, F.C.; FEUERSTEIN, G.Z. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. **J Neurosci**. 1999 Jul 15;19(14):5932-41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-14-05932.1999.

VELTKAMP, R.; GILL, D. Clinical Trials of Immunomodulation in Ischemic Stroke. **Neurotherapeutics**. 2016 Oct;13(4):791-800. doi: 10.1007/s13311-016-0458-y. VIDELA, L.A.; VARGAS, R.; VALENZUELA, R.; MUÑOZ, P.; CORBARI, A.; HERNANDEZ-RODAS, M.C. Combined administration of docosahexaenoic acid and thyroid hormone synergistically enhances rat liver levels of resolvins RvD1 and RvD2. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. 2019 Jan;140:42-46. doi: 10.1016/j.plefa.2018.11.013.

WAJNGARTEN, M.; SILVA, G.S. Hypertension and Stroke: Update on Treatment. **Eur Cardiol**. 2019 Jul 11;14(2):111-115. doi: 10.15420/ecr.2019.11.1.

WANG, T.; MU, H.; LIU, G. The anti-ischemic effect of O, O-acetyldaurisoline. **Acta Pharmaceutica Sinica**. v. 33, n. 4, p. 241-244, 1998.

WANG, Y.; KIM, N.S.; HAINCE, J.F.; KANG, H.C.; DAVID, K.K.; ANDRABI, S.A.; POIRIER, G.G.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). **Sci Signal**. 2011a Apr 5;4(167):ra20. doi: 10.1126/scisignal.2000902.

WANG, B.; GONG, X.; WAN, J.Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; LI, H.Z.; MIN, S. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. **Pulm Pharmacol Ther**. 2011 Aug;24(4):434-41. doi: 10.1016/j.pupt.2011.04.001.

WANG, Y.; AN, R.; UMANAH, G.K.; PARK, H.; NAMBIAR, K.; EACKER, S.M.; KIM, B.; BAO, L.; HARRAZ, M.M.; CHANG, C.; CHEN, R.; WANG, J.E.; KAM, T.I.; JEONG, J.S.; XIE, Z.; NEIFERT, S.; QIAN, J.; ANDRABI, S.A.; BLACKSHAW, S.; ZHU, H.; SONG, H.; MING, G.L.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. **Science**. 2016 Oct 7;354(6308):aad6872. doi: 10.1126/science.aad6872.

WANG, E.W.; HAN, Y.Y.; JIA, X.S. PAFR-deficiency alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice via suppressing inflammation, oxidative stress and

apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun.** 2018 Jan 22;495(4):2475-2481. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.132.

WEISINGER, H.S.; ARMITAGE, J.A.; JEFFREY, B.G.; MITCHELL, D.C.; MORIGUCHI, T.; SINCLAIR, A.J.; WEISINGER, R.S.; SALEM, N.JR. Retinal sensitivity loss in third-generation n-3 PUFA-deficient rats. **Lipids.** 2002 Aug;37(8):759-65. doi: 10.1007/s11745-002-0958-3.

WHEELER, T.G.; BENOLKEN, R.M.; ANDERSON, R.E. Visual membranes: specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. **Science.** 1975 Jun 27;188(4195):1312-4. doi: 10.1126/science.1145197.

WIDMANN, C.; GANDIN, C.; PETIT-PAITEL, A.; LAZDUNSKI, M.; HEURTEAUX, C. The Traditional Chinese Medicine MLC901 inhibits inflammation processes after focal cerebral ischemia. **Sci Rep.** 2018 Dec 24;8(1):18062. doi: 10.1038/s41598-018-36138-0.

WIMMER, I.; ZRZAVY, T.; LASSMANN, H. Neuroinflammatory responses in experimental and human stroke lesions. **J Neuroimmunol.** 2018 Oct 15;323:10-18. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.07.003.

WOODRUFF, T.M.; THUNDYIL, J.; TANG, S.C.; SOBEY, C.G.; TAYLOR, S.M.; ARUMUGAM, T.V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Mol Neurodegener.** 2011 Jan 25;6(1):11. doi: 10.1186/1750-1326-6-11.

WU, M.H.; HUANG, C.C.; CHIO, C.C.; TSAI, K.J.; CHANG, C.P.; LIN, N.K.; LIN, M.T. Inhibition of Peripheral TNF- α and Downregulation of Microglial Activation by Alpha-Lipoic Acid and Etanercept Protect Rat Brain Against Ischemic Stroke. **Mol Neurobiol.** 2016 Sep;53(7):4961-71. doi: 10.1007/s12035-015-9418-5.

YANG, C.; DEMARS, K.M.; ALEXANDER, J.C.; FEBO, M.; CANDELARIO-JALIL, E. Sustained Neurological Recovery After Stroke in Aged Rats Treated With a Novel Prostacyclin Analog. **Stroke.** 2017 Jul;48(7):1948-1956. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.016474.

YIGITKANLI, K.; PEKCEC, A.; KARATAS, H.; PALLAST, S.; MANDEVILLE, E.; JOSHI, N.; SMIRNOVA, N.; GAZARYAN, I.; RATAN, R.R.; WITZTUM, J.L.; MONTANER, J.; HOLMAN, T.R.; LO, E.H.; VAN LEYEN, K. Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. **Ann Neurol.** 2013 Jan;73(1):129-35. doi: 10.1002/ana.23734.

YIN, X.M.; LUO, Y.; CAO, G.; BAI, L.; PEI, W.; KUHARSKY, D.K.; CHEN, J. Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. **J Biol Chem.** 2002 Nov 1;277(44):42074-81. doi: 10.1074/jbc.M204991200.

YIN, X.J.; CHEN, Z.Y.; ZHU, X.N.; HU, J.J. Loss of PAFR prevents neuroinflammation and brain dysfunction after traumatic brain injury. **Sci Rep.** 2017 Jan 17;7:40614. doi: 10.1038/srep40614.

XIONG XY, LIU L, YANG QW. Refocusing Neuroprotection in Cerebral Reperfusion Era: New Challenges and Strategies. **Front Neurol**. 2018 Apr 23;9:249. doi: 10.3389/fneur.2018.00249.

XU, W.; JIN, W.; ZHANG, X.; CHEN, J.; REN, C. Remote Limb Preconditioning Generates a Neuroprotective Effect by Modulating the Extrinsic Apoptotic Pathway and TRAIL-Receptors Expression. **Cell Mol Neurobiol**. 2017 Jan;37(1):169-182. doi: 10.1007/s10571-016-0360-5.

ZASŁONA, Z.; PRZYBRANOWSKI, S.; WILKE, C.; VAN ROOIJEN, N.; TEITZ-TENNENBAUM, S.; OSTERHOLZER, J.J.; WILKINSON, J.E.; MOORE, B.B.; PETERS-GOLDEN, M. Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. **J Immunol**. 2014 Oct 15;193(8):4245-53. doi: 10.4049/jimmunol.1400580.

ZHANG, Y.G.; LIU, T.P. Influences of ginsenosides Rb1 and Rg1 on reversible focal brain ischemia in rats. **Acta Pharmaceutica Sinica**. 1996 Jan;17(1):44-8.

ZHANG, C.S.; HAWLEY, S.A.; ZONG, Y.; LI, M.; WANG, Z.; GRAY, A.; MA, T.; CUI, J.; FENG, J.W.; ZHU, M.; WU, Y.Q.; LI, T.Y.; YE, Z.; LIN, S.Y.; YIN, H.; PIAO, H.L.; HARDIE, D.G.; LIN, S.C. Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. **Nature**. 2017 Aug 3;548(7665):112-116. doi: 10.1038/nature23275.

ZHAO, B.; FEI, Y.; ZHU, J.; YIN, Q.; FANG, W.; LI, Y. PAF Receptor Inhibition Attenuates Neuronal Pyroptosis in Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. **Mol Neurobiol**. 2021 Dec;58(12):6520-6539. doi: 10.1007/s12035-021-02537-0.

ZHAO, Y.; ZHANG, X.; CHEN, X.; WEI, Y. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review). **Int J Mol Med**. 2022 Feb;49(2):15. doi: 10.3892/ijmm.2021.5070.

ZHU, H.; HU, S.; LI, Y.; SUN, Y.; XIONG, X.; HU, X.; CHEN, J.; QIU, S. Interleukins and Ischemic Stroke. **Front Immunol**. 2022 Jan 31;13:828447. doi: 10.3389/fimmu.2022.828447.

ANEXO A

APROVAÇÃO DA INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)



Amendment: Change in Personnel

Request to remove or add personnel to IBC, IACUC, IRB Projects

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

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.

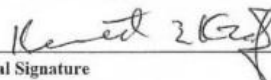
IBC #	AF	IACUC#	AF	IRB#	AF	Project Title
14324		3778	3			Neuroprotection Lipid Signaling in Ischemia Reperfusion

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	9/24/19
Reducing Pain and Distress in Laboratory Mice and Rats	CITI	9/24/19
List Species Working with in Research Settings: mice	CITI	9/24/19
List Species Working with in Research Settings: rats	CITI	9/24/19
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

10/21/19

Date of Approval

APÊNDICE A

ARTIGO 1 PUBLICADO

Original Article



Blocking pro-inflammatory platelet-activating factor receptors and activating cell survival pathways: A novel therapeutic strategy in experimental ischemic stroke

Ludmila Belayev¹, Andre Obenaus², Pranab K. Mukherjee¹, Eric J. Knott¹, Larissa Khoutorova¹, Madigan M. Reid¹, Cassia R. Roque^{1,3}, Lawrence Nguyen², Jeong Bin Lee², Nicos A. Petasis⁴, Reinaldo B. Oria^{1,3}, Nicolas G. Bazan¹

¹Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, ²Department of Pediatrics, School of Medicine, University of California, Irvine, ³Department of Chemistry, University of Southern California, Los Angeles, CA, ⁴Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Laboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil

Address for correspondence:

Dr. Ludmila Belayev, Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health New Orleans, 2020 Gravier Street, Suite D, New Orleans, LA, 70112, USA.
E-mail: lbelay@lsuhsc.edu
Dr. Nicolas G. Bazan, Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health New Orleans, 2020 Gravier Street, Suite D, New Orleans, LA, 70112, USA.
E-mail: nbazan@lsuhsc.edu

Submission: 17-08-2020

Revised: 10-09-2020

Accepted: 18-10-2020

Published: 29-12-2020

Abstract:

OBJECTIVE: Acute ischemic stroke triggers complex neurovascular, neuroinflammatory, and synaptic alterations. This study explores whether blocking pro-inflammatory platelet-activating factor receptor (PAF-R) plus selected docosanoids after middle cerebral artery occlusion (MCAo) would lead to neurological recovery. The following small molecules were investigated: (a) LAU-0901, a PAF-R antagonist that blocks pro-inflammatory signaling; and (b) derivatives of docosahexaenoic acid (DHA), neuroprotectin D1 (NPD1), and aspirin-triggered NPD1 (AT-NPD1), which activates cell survival pathways and exert potent anti-inflammatory activity in the brain.

MATERIALS AND METHODS: Sprague-Dawley rats received 2 h MCAo and LAU-0901 (30 or 60 mg/kg, 2 h after stroke), NPD1, and AT-NPD1 (333 µg/kg), DHA (5 mg/kg), and their combination were administered intravenously at 3 h after stroke. Behavior testing and *ex vivo* magnetic resonance imaging were conducted on day 3 or 14 to assess lesion characteristics and lipidomic analysis on day 1. Series 1 (LAU-0901 + NPD1, 14d), Series 2 (LAU-0901 + AT-NPD1, 3d), and Series 3 (LAU-0901 + DHA, 1d).

RESULTS: All combinatory groups improved behavior compared to NPD1, AT-NPD1, or DHA treatments alone. Total lesion volumes were reduced with LAU-0901 + NPD1 by 62% and LAU-0901 + AT-NPD1 by 90% treatments versus vehicle groups. LAU-0901 and LAU-0901 + DHA increased the production of vasoactive lipid mediators (prostaglandins: PGE₂, PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α}, and PGD₂) as well as inflammatory regulating mediator hydroxyoctadecadienoic acid. In contrast, LAU-0901 and LAU-0901 + DHA decreased the production of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, a pro-inflammatory mediator.

CONCLUSION: Combination therapy with LAU-0901 and selected docosanoids is more effective than the single therapy, affording synergistic neuroprotection, with restored pro-homeostatic lipid mediators and improved neurological recovery. Altogether, our findings support the combinatory therapy as the basis for future therapeutics for ischemic stroke.

Keywords:

Docosanoids, ischemia/reperfusion, magnetic resonance imaging, neuroinflammation, platelet-activating factor-receptors antagonist

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: WKHLRPMedknow_reprints@wolterskluwer.com

How to cite this article: Belayev L, Obenaus A, Mukherjee PK, Knott EJ, Khoutorova L, Reid MM, et al. Blocking pro-inflammatory platelet-activating factor receptors and activating cell survival pathways: A novel therapeutic strategy in experimental ischemic stroke. *Brain Circ* 2020;6:260-8.

APÊNDICE B

ARTIGO 2 PUBLICADO

Toxicology 464 (2021) 152992



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol



Methylmercury chronic exposure affects the expression of DNA single-strand break repair genes, induces oxidative stress, and chromosomal abnormalities in young dyslipidemic APOE knockout mice

Cássia R. Roque^{b,1}, Letícia R. Sampaio^{a,1}, Mayumi N. Ito^a, Daniel V. Pinto^b, Juan S. R. Caminha^b, Paulo I.G. Nunes^c, Ramon S. Raposo^d, Flávia A. Santos^c, Cláudia C. Windmüller^e, Maria Elena Crespo-Lopez^f, Jacqueline I. Alvarez-Leite^e, Reinaldo B. Oriá^{b,*}, Ronald F. Pinheiro^a

^a Cancer Cytogenomics Laboratory, Drug Research, and Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c Natural Products Laboratory, Biomedicine Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Experimental Biology core, Health Sciences, University of Fortaleza, Fortaleza, CE, Brazil

^e Laboratory of Atherosclerosis and Nutritional Biochemistry, Department of Biochemistry and Immunology, ICB, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^f Laboratory of Molecular Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Gary Rankin

Keywords:

Methylmercury
Dyslipidemia
ApoE knockout mice
Oxidative stress
DNA repair

ABSTRACT

Mercury (Hg) is one of the most toxic environmental pollutants, especially when methylated, forming methylmercury (MeHg). MeHg affects DNA repair, increases oxidative stress, and predisposes to cancer. MeHg neurotoxicity is well-known, but recently MeHg-associated cardiovascular effects were recognized. This study evaluated circulating lipids, oxidative stress, and genotoxicity after MeHg-chronic exposure (20 mg/L in drinking water) in C57BL/6J wild-type and APOE knockout (ko) mice, the latter, being spontaneously dyslipidemic. Experimental mice were assigned to four groups: non-intoxicated and MeHg-intoxicated wild-type mice and non-intoxicated and MeHg-intoxicated APOE ko mice. Plasma levels of triglycerides, total cholesterol (TC), HDL, and LDL were analyzed. Liver lipid peroxidation and splenic gene expression of xeroderma pigmentosum complementation groups A, C, D, and G (XPA, XPC, XPD, and XPG), X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1), and telomerase reverse transcriptase (TERT) were measured. Fur Hg levels confirmed chronic MeHg intoxication. MeHg exposure raises TC levels both in wild-type and APOE ko mice. HDL and LDL-cholesterol levels were increased only in the MeHg-challenged APOE ko mice. MeHg increased liver lipid peroxidation, regardless of the genetic background. Unintoxicated APOE ko mice showed higher expression of TERT than all other groups. APOE deficiency increases XPA expression, regardless of MeHg intoxication. Furthermore, MeHg-intoxicated mice had more cytogenetic abnormalities, effect which was independent of APOE deficiency. More studies are needed to dissect the interactions between circulating lipids, MeHg intoxication, and DNA-repair pathways even at young age, interactions that likely play critical roles in cell senescence and the risk for chronic disorders later in life.

1. Introduction

Mercury (Hg) is one of the oldest chemical elements used in human

health applications and of the most dangerous environmental pollutants (Berzas Nevado et al., 2010; Arrifano et al., 2018c). Human activities diversity and intensify the presence of this metal in the environment

* Corresponding author at: Laboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny, and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo 1315, Rodolfo Teófilo, 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil.

E-mail address: oria@ufc.br (R.B. Oriá).

¹ Equal credits.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152992>

Received 20 January 2021; Received in revised form 1 October 2021; Accepted 12 October 2021

Available online 17 October 2021

0300-483X/© 2021 Elsevier B.V. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).

APÊNDICE C

ARTIGO 3 PUBLICADO

0521-0103/390/147-53\$35.00
THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS
Copyright © 2021 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

<https://doi.org/10.1124/jpet.121.000798>
J Pharmacol Exp Ther 380:47–53, January 2022

Minireview

The Role of Ruthenium Compounds in Neurologic Diseases: A Minireview

Fátima Virgínia Gama Justi, Gabriella Araújo Matos, Juan de Sá Roriz Caminha, Cássia Rodrigues Roque, Edinilton Muniz Carvalho, Márcio Wilker Soares Campelo, Ludmila Belayev, Luiz Gonzaga de França Lopes, and Reinaldo Barreto Oriá

Department of Morphology and the Institute of Biomedicine, School of Medicine (F.V.G.J., G.A.M., J.d.S.R.C., C.R.R., R.B.O.) and Department of Organic and Inorganic Chemistry (E.M.C., L.G.d.F.L.), Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana (L.B.); and Laboratory of Experimental Vascular Surgery and Gene Expression, School of Medicine, Christus University Center (UNICHRISTUS), Fortaleza, Brazil (M.W.S.C.)

Received June 17, 2021; accepted October 25, 2021

ABSTRACT

Ruthenium compounds, nitric oxide donors in biologic systems, have emerged as a promising therapeutic alternative to conventional drugs in anticancer chemotherapy and as a potential neuroprotective agent with fewer cytotoxic effects. This minireview summarizes promising studies with ruthenium complexes and their roles in cancer, neuroinflammation, neurovascular, and neurodegenerative diseases. The up-to-date evidence supports that ruthenium-based compounds have beneficial effects against gliomas and other types of brain cancers, reduce motor symptoms in models of cerebral ischemia-reperfusion, and may act in the control of nociceptive and

inflammatory events, such as those seen in early Alzheimer's disease. More studies are needed to fill many current knowledge gaps about the intricate and complex biologic effects and therapeutic-related mechanisms of ruthenium, stimulating further research.

SIGNIFICANCE STATEMENT

This minireview summarizes studies addressing the role of ruthenium compounds on neurological illnesses, focusing on brain cancer and neurovascular and neurodegenerative diseases. No such review is available in the literature.

Introduction

Many metal ions (e.g., copper, zinc, iron, and manganese) play a crucial role in various biologic processes, potentially influencing medical treatment (Arnesano and Natile, 2009). Preparations containing metal complexes have been used historically in clinical medicine, and over the past five decades, they have attracted the pharmaceutical industry's attention in the relentless search for new therapeutic approaches against cancer and neurologic diseases (Pricker, 1996; Thota et al.,

2018; Englinger et al., 2019). These worrisome chronic illnesses are expected to increase dramatically with aging populations worldwide (Nolen et al., 2017; GBD 2016 Neurology Collaborators, 2019). One of the eldest and best known metallodrug-therapeutic approaches is platinum-based anticancer therapy with cisplatin or platanol (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]), with antitumoral effects first reported by a pioneer study of Barnett Rosenberg and Loretta VanCamp in 1965 (Arnesano and Natile, 2009).

Several other metallodrugs have been used in empirical medicine throughout history, e.g., auranofin (based in gold) used in the treatment of rheumatoid arthritis, trisenox (based in arsenic) used in the treatment of acute promyelocytic leukemia, and sodium nitroprusside (based in iron) used in cardiovascular surgery and hypertensive emergency (Pricker, 1996). The suboptimal activity and

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [Projeto Universal n° 406585/2016-4] and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes) [CAPES Print n°: 88887.311938/2018-00].
[dx.doi.org/10.1124/jpet.121.000798](https://doi.org/10.1124/jpet.121.000798)

ABBREVIATIONS: Aβ, β-amyloid; AD, Alzheimer's disease; 8-HQ, 8-hydroxyquinoline; KP1019, indazolium *trans*-tetrachlorobis(1*H*-indazole) ruthenate(III); MCU, mitochondrial calcium uniporter; NAMI-A, imidazolium(imidazole)(dimethylsulfoxide)tetrachlororuthenate(III); NO, nitric oxide; PDT, photodynamic therapy; PrP, prion protein; ROS, reactive oxygen species; RR, ruthenium red; Ru, ruthenium; 106Ru, ruthenium-106 plaque radiotherapy; RuBi-GABA, ruthenium-bipyridine-trimethylphosphine gamma aminobutyric acid; RuBi-Glu, ruthenium-bipyridine-trimethylphosphine glutamate; Rut-bpy, ruthenium nitrosyl complex *cis*-[Ru(bpy)₂(SO₃)(NO)]PF₆; TLD1433, [Ru(II)](4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine(dmb))₂[2,2':2'',2''':5'',5'''-terthiophene-imidazo[4,5-*fj*][1,10]phe-nanthroline]Cl₂; TQ-6, Ru(η⁶-cymene)2-(1*H*-benzimidazol-2-yl)-quinoline C[BF₄]; TRPV, transient receptor potential cation channel vanilloid subfamily.

APÊNDICE D

ARTIGO 4 PUBLICADO

Lead Article

Immunoinflammatory role of apolipoprotein E4 in malnutrition and enteric infections and the increased risk for chronic diseases under adverse environments

Raul S. Freitas, Cássia R. Roque, Gabriella A. Matos, Ludmila Belayev, Orleânio G. R. de Azevedo, Jacqueline I. Alvarez-Leite, Richard L. Guerrant, and Reinaldo B. Oriá

Apolipoprotein E plays a crucial role in cholesterol metabolism. The immunomodulatory functions of the human polymorphic APOE gene have gained particular interest because APOE4, a well-recognized risk factor for late-onset Alzheimer's disease, has also been recently linked to increased risk of COVID-19 infection severity in a large UK biobank study. Although much is known about apoE functions in the nervous system, much less is known about APOE polymorphism effects on malnutrition and enteric infections and the consequences for later development in underprivileged environments. In this review, recent findings are summarized of apoE's effects on intestinal function in health and disease and the role of APOE4 in protecting against infection and malnutrition in children living in unfavorable settings, where poor sanitation and hygiene prevail, is highlighted. The potential impact of APOE4 on later development also is discussed and gaps in knowledge are identified that need to be addressed to protect children's development under adverse environments.

INTRODUCTION

Since the discovery of apolipoprotein E (apoE) in 1973, significant advances have occurred in understanding the role of this cholesterol carrier molecule, coded by a polymorphic APOE gene, in health and disease states. Recently, the association of the APOE4 gene with COVID-19 infection severity^{1,2} and the potential association with the COVID-19-related cytokine storm has

ignited even more interest in the immunomodulatory role of apoE. Although much of apoE function has been recognized in brain plasticity and nervous tissue injury and neurodegeneration,^{3,4} less is known about how apoE isoforms affect intestinal barrier function, gut microbiota, and intestinal mucosal immunity under adverse conditions. Thus, in this review, we highlight novel concepts of apoE immune-inflammatory functions, with a special focus on APOE4, a well-recognized

Affiliation: R.S. Freitas, C.R. Roque, G.A. Matos, O.G.R. de Azevedo, and R.B. Oriá are with the 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, Ceará, Brazil; L. Belayev is with the Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Health Sciences Center, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, United States; J.I. Alvarez-Leite is with the Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Brazil; R.L. Guerrant is with the Center for Global Health, Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, United States

Correspondence: R. B. Oriá, Laboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Rua Coronel Nunes de Melo 1315, Rodolfo Teófilo, 60430-270—Fortaleza, CE, Brazil. E-mail: oria@ufc.br.

Key words: adverse environment, apolipoprotein E, enteric infections, innate immunity, malnutrition, systemic inflammation

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the International Life Sciences Institute. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

doi: 10.1093/nutrit/nuab063

Nutrition Reviews® Vol. 80(5):1001–1012

1001

APÊNDICE E

ARTIGO 5 PUBLICADO



HHS Public Access

Author manuscript

J Stroke Cerebrovasc Dis. Author manuscript; available in PMC 2023 March 01.

Published in final edited form as:

J Stroke Cerebrovasc Dis. 2022 August ; 31(8): 106585. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106585.

Synergistic Neuroprotection by a PAF Antagonist Plus a Docosanoid in Experimental Ischemic Stroke: Dose-Response and Therapeutic Window

Madigan M. Reid, BS^a, Andre Obenaus, PhD^b, Pranab K. Mukherjee, PhD^a, Larissa Khoutorova, BS^a, Cassia R. Roque, PhD^c, Nicos A. Petasis, PhD^d, Reinaldo B. Oria, PhD^c, Ludmila Belayev, MD^a, Nicolas G. Bazan, MD, PhD^a

^aNeuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health New Orleans, New Orleans, LA, USA

^bDepartment of Pediatrics, School of Medicine, University of California, Irvine, CA, USA

^cLaboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil

^dDepartment of Chemistry, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA.

Abstract

Objective: We tested the hypothesis that blocking pro-inflammatory platelet-activating factor receptor (PAFR) with LAU-0901 (LAU) plus administering a selected docosanoid, aspirin-triggered neuroprotectin D1 (AT-NPD1), which activates cell-survival pathways after middle cerebral artery occlusion (MCAo), would lead to neurological recovery. Dose-response and therapeutic window were investigated.

Materials and methods: Male SD rats were subjected to 2 hours of MCAo. Behavior testing (days 1–7) and *ex vivo* MRI on day 7 were conducted. In dose-response, rats were treated with LAU (45 and 60 mg/kg; IP), AT-NPD1 (111, 222, 333 µg/kg; IV), LAU+AT-NPD1 (LAU at 3 hours and AT-NPD1 at 3.15 hours) or vehicle. In the therapeutic window, vehicle, LAU (60 mg/kg), AT-NPD1 (222 µg/kg), and LAU +AT-NPD1 were administered at 3, 4, 5, and 6 hours after onset of MCAo.

Results: LAU and AT-NPD1 treatments alone improved behavior by 40–42% and 20–30%, respectively, and LAU+AT-NPD1 by 40% compared to the vehicle group. T2-weighted imaging

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Corresponding author at: Professor of Neurosurgery, Neurology, and Neuroscience, Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health New Orleans, 2020 Gravier Street, Suite 9B16, Room 935A, New Orleans, LA 70112, USA mreid1@lsuhsc.edu.

Authors contributions

NGB and LB conceptualized and designed the experiments. MMR, LK, CR, AO, NP, and PMK acquired the data. LB, AO, and MMR analyzed and interpreted the data. MMR and LB performed the statistical analysis. NGB, LB, and MMR drafted the article. LB, NGB, and RO critically revised the article. All authors reviewed the submitted version of the manuscript. LB and NGB approved the final version of the manuscript on behalf of all authors. RO, PMK, NP, and LB provided Administrative/technical/material support. NGB and LB supervised the study.

Declaration of Competing Interest

The authors report no conflicts of interest.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

APÊNDICE F

ARTIGO 6 PUBLICADO



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Chronic Methylmercury Intoxication Induces Systemic Inflammation, Behavioral, and Hippocampal Amino Acid Changes in C57BL/6J Adult Mice

Tyciane S. Nascimento ¹, Daniel V. Pinto ², Ronaldo P. Dias ², Ramon S. Raposo ³, Paulo Iury G. Nunes ⁴,
Cássia R. Roque ², Flávia A. Santos ⁴, Geanne M. Andrade ¹, José Lucas Viana ⁵, Anne H. Fostier ⁵,
Alessandra Sussulini ⁵, Jacqueline I. Alvarez-Leite ⁶, Carlos Fontes-Ribeiro ⁷, João O. Malva ⁷
and Reinaldo B. Oriá ^{2,*}

¹ Neuroscience and Behavior Laboratory, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-275, Brazil

² Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny, and Nutrition, Department of Morphology and Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-270, Brazil

³ Experimental Biology Core, Health Sciences Center, University of Fortaleza, Fortaleza 60812-020, Brazil

⁴ Natural Products Laboratory, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-270, Brazil

⁵ Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, University of Campinas—UNICAMP, Campinas 13083-862, Brazil

⁶ Laboratory of Atherosclerosis and Nutritional Biochemistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

⁷ Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Institute of Pharmacology and Experimental Therapeutics and Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB), Faculty of Medicine, University of Coimbra, 3000-548 Coimbra, Portugal

* Correspondence: oria@ufc.br



Citation: Nascimento, T.S.; Pinto, D.V.; Dias, R.P.; Raposo, R.S.; Nunes, P.I.G.; Roque, C.R.; Santos, F.A.; Andrade, G.M.; Viana, J.L.; Fostier, A.H.; et al. Chronic Methylmercury Intoxication Induces Systemic Inflammation, Behavioral, and Hippocampal Amino Acid Changes in C57BL/6J Adult Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13837. <https://doi.org/10.3390/ijms232213837>

Academic Editor: João Pedro Silva

Received: 5 October 2022

Accepted: 26 October 2022

Published: 10 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Methylmercury (MeHg) is highly toxic to the human brain. Although much is known about MeHg neurotoxic effects, less is known about how chronic MeHg affects hippocampal amino acids and other neurochemical markers in adult mice. In this study, we evaluated the MeHg effects on systemic lipids and inflammation, hippocampal oxidative stress, amino acid levels, neuroinflammation, and behavior in adult male mice. Challenged mice received MeHg in drinking water (2 mg/L) for 30 days. We assessed weight gain, total plasma cholesterol (TC), triglycerides (TG), endotoxin, and TNF levels. Hippocampal myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), acetylcholinesterase (AChE), amino acid levels, and cytokine transcripts were evaluated. Mice underwent open field, object recognition, Y, and Barnes maze tests. MeHg-intoxicated mice had higher weight gain and increased the TG and TC plasma levels. Elevated circulating TNF and LPS confirmed systemic inflammation. Higher levels of MPO and MDA and a reduction in IL-4 transcripts were found in the hippocampus. MeHg-intoxication led to increased GABA and glycine, reduced hippocampal taurine levels, delayed acquisition in the Barnes maze, and poor locomotor activity. No significant changes were found in AChE activity and object recognition. Altogether, our findings highlight chronic MeHg-induced effects that may have long-term mental health consequences in prolonged exposed human populations.

Keywords: methylmercury; metabolism; hippocampus; neurotransmission; oxidative stress; neuroinflammation; behavior

1. Introduction

Mercury (Hg) is a ubiquitous heavy metal occurring in nature, but its environmental levels may be markedly increased due to anthropogenic activities such as illegal artisanal gold mining and industrial wasting [1].

APÊNDICE G

ARTIGO 7 PUBLICADO

BRAZ J INFECT DIS. 2023;27(3):102776



The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Original Article

Myeloperoxidase as a biomarker for intestinal-brain axis dysfunction induced by malnutrition and *Cryptosporidium* infection in weanling mice

Reinaldo B. Oriá^{a,b}, Deiziane V.S. Costa^b,
Pedro Henrique Q.S. de Medeiros^{b,c}, Cássia R. Roque^{b,a}, Ronaldo P. Dias^a,
Cirle A. Warren^b, David T. Bolick^{b,*}, Richard L. Guerrant^b

^a Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Departamento de Morfologia e Instituto de Biomedicina, Laboratório de Cicatrização de Tecidos, Ontogenia e Nutrição, Fortaleza, CE, Brazil

^b University of Virginia School of Medicine, Department of Medicine, Division of Infectious Diseases and International Health, Center for Global Health Equality, Charlottesville, USA

^c Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Instituto de Biomedicina, Laboratório de Doenças Infecciosas, Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2022

Accepted 21 April 2023

Available online 5 May 2023

Keywords:

Cryptosporidium parvum

Malnutrition

Gut

Neuroinflammation

Myeloperoxidase

ABSTRACT

Cryptosporidiosis is a waterborne protozoal infection that may cause life-threatening diarrhea in undernourished children living in unsanitary environments. The aim of this study is to identify new biomarkers that may be related to gut-brain axis dysfunction in children suffering from the malnutrition/infection vicious cycle is necessary for better intervention strategies. Myeloperoxidase (MPO) is a well-known neutrophil-related tissue factor released during enteropathy that could drive gut-derived brain inflammation. We utilized a model of environmental enteropathy in C57BL/6 weanling mice challenged by *Cryptosporidium* and undernutrition. Mice were fed a 2%-Protein Diet (dPD) for eight days and orally infected with 10^7 -*C. parvum* oocysts. *C. parvum* oocyst shedding was assessed from fecal and ileal-extracted genomic DNA by qRT-PCR. Ileal histopathology scores were assessed for intestinal inflammation. Prefrontal cortex samples were snap-frozen for MPO ELISA assay and NF- κ B immunostaining. Blood samples were drawn by cardiac puncture after anesthesia and sera were obtained for serum amyloid A (SAA) and MPO analysis. Brain samples were also obtained for Iba-1 prefrontal cortex immunostaining. *C. parvum*-infected mice showed sustained stool oocyst shedding for six days post-infection and increased fecal MPO and inflammation scores. dPD and cryptosporidiosis led to impaired growth and weight gain. *C. parvum*-infected dPD mice showed increased serum MPO and serum amyloid A (SAA) levels, markers of systemic inflammation. dPD-infected mice showed greater MPO, NF- κ B expression, and Iba-1 immunolabeling in the prefrontal cortex, an important brain region involved in executive function. Our findings suggest MPO as a potential biomarker for intestinal-brain axis dysfunction due to environmental enteropathy.

© 2023 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

* Corresponding author.

E-mail address: dtbolick1@gmail.com (D.T. Bolick).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.102776>

1413-8670/© 2023 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

APÊNDICE H

ARTIGO 8 PUBLICADO

Cellular and Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s10571-023-01363-3>

ORIGINAL RESEARCH



NPD1 Plus RvD1 Mediated Ischemic Stroke Penumbra Protection Increases Expression of Pro-homeostatic Microglial and Astrocyte Genes

Madigan M. Reid¹ · Marie-Audrey I. Kautzmann¹ · Gethein Andrew¹ · Andre Obenaus² · Pranab K. Mukherjee¹ · Larissa Khoutorova¹ · Jeff X. Ji¹ · Cassia R. Roque³ · Reinaldo B. Oria³ · Bola F. Habeb¹ · Ludmila Belayev^{1,5} · Nicolas G. Bazan^{1,4}

Received: 8 March 2023 / Accepted: 13 May 2023
 © The Author(s) 2023

Abstract

Neuroprotection to attenuate or block the ischemic cascade and salvage neuronal damage has been extensively explored for treating ischemic stroke. However, despite increasing knowledge of the physiologic, mechanistic, and imaging characterizations of the ischemic penumbra, no effective neuroprotective therapy has been found. This study focuses on the neuroprotective bioactivity of docosanoid mediators: Neuroprotectin D1 (NPD1), Resolvin D1 (RvD1), and their combination in experimental stroke. Molecular targets of NPD1 and RvD1 are defined by following dose–response and therapeutic window. We demonstrated that treatment with NPD1, RvD1, and combination therapy provides high-grade neurobehavioral recovery and decreases ischemic core and penumbra volumes even when administered up to 6 h after stroke. The expression of the following genes was salient: (a) *Cd163*, an anti-inflammatory stroke-associated gene, was the most differentially expressed gene by NPD1+RvD1, displaying more than a 123-fold upregulation in the ipsilesional penumbra (Lisi et al., *Neurosci Lett* 645:106–112, 2017); (b) 100-fold upregulation takes place in astrocyte gene *PTX3*, a key regulator of neurogenesis and angiogenesis after cerebral ischemia (Rodriguez-Grande et al., *J Neuroinflammation* 12:15, 2015); and (c) *Tmem119* and *P2y12*, two markers of homeostatic microglia, were found to be enhanced by ten- and fivefold, respectively (Walker et al. *Int J Mol Sci* 21:678, 2020). Overall, we uncovered that protection after middle cerebral artery occlusion (MCAo) by the lipid mediators elicits expression of microglia and astrocyte-specific genes (*Tmem119*, *Fcrls*, *Osmr*, *Msr1*, *Cd68*, *Cd163*,

✉ Ludmila Belayev
 lbelay@lsuhsc.edu

✉ Nicolas G. Bazan
 NBazan@lsuhsc.edu

¹ Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, LA 70112, USA

² Department of Pediatrics, School of Medicine, University of California, Irvine, CA 92618, USA

³ 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, Brazil

⁴ Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health New Orleans, Neuroscience Center of Excellence, 2020 Gravier Street, Suite D, New Orleans, LA 70112, USA

⁵ Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health New Orleans, 2020 Gravier St, Suite 9B16, Room 935A, New Orleans, LA 70112, USA

APÊNDICE I
CAPÍTULO DE LIVRO 1 PUBLICADO

CHAPTER 2

Recent advances in the development of immunosensors for infectious diseases

Stephen Rathinaraj Benjamin^{1,2}, Tyciane de Souza Nascimento^{1,3},
Cássia Rodrigues Roque⁴, Geanne Matos de Andrade^{1,2} and
Reinaldo Barreto Oriá⁴

¹Center for Research and Drug Development (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

³Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

⁴Department of Morphology, Institute of Biomedicine, Laboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

2.1 Introduction

The emergence of infectious diseases in a global society is a cause of concern for the general population. Emerging viruses (e.g., Dengue virus, West Nile virus, Influenza A virus, etc.) have received a lot of attention in recent years, highlighting the need for more efficient diagnostic techniques in the medical field [1]. Viruses causes numerous illnesses lead to hundreds of thousands of deaths annually notably influenza, Ebola, the Middle East Respiratory Syndrome (MERS), HIV (human immunodeficiency virus), and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and more recently coronavirus disease (COVID-19). These are among the smallest identified infectious agents for humans and contain just a few genes typically embedded in a protein capsid and a lipid envelope [2]. The translation of these genes only takes place in the machinery of the host cell, which is utilized by the intercellular parasite to manufacture millions of new viral particles that operate similarly and have severe effects. The early and accurate identification of viral illnesses in this situation is also significant for improving clinical results so that physicians may take appropriate measures. At present, the gold standard methods used to diagnose viral diseases include PCR (polymerase chain reaction) and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Both have sufficient detection limits and accuracy but need specialist reagents, staff, and equipment to be carried out with limited accessibility

APÊNDICE J
CAPÍTULO DE LIVRO 2 PUBLICADO

Chapter 18

Nanobiosensors Potentialities for Monitoring SARS-CoV-2 in the Environment



**Stephen Rathinaraj Benjamin, Kshitij RB Singh,
Tyciane de Souza Nascimento, Cássia Rodrigues Roque,
Geanne Matos de Andrade, and Reinaldo Barreto Oriá**

Abstract The worldwide pandemic of coronavirus disease—2019 (COVID-19) is a devastating and distressing scenario that highlights humanity's inability to build fast diagnostic tools for emerging infectious diseases. However, the majority of existing approaches have a significant probability of false negatives, leading in patient diagnostic errors and prolonging therapy. Nanoparticles have shown significant improvement and have the potential to be used as a platform for quickly and accurately identifying viral infection. The relevance of nanoparticles is potential platforms for COVID-19 diagnostics was emphasized in this research. In addition, nanomaterials have surface chemistry, which may be beneficial for the bioconjugation of molecules, large surface potential, and a significant amplification impact on signals. Due to various potential benefits, metallic nanomaterials like gold, silver nanoparticles, and carbon-based nanomaterials (carbon nanotube and graphene), nanogels, and photonic crystals are utilized for biosensing applications. In compared to traditional techniques for identifying severe acute respiratory syndrome coronavirus—2 (SARS-CoV-2), this study covers the most relevant aspects of nanobiosensor-based diagnostics techniques. Additionally, major potential challenges and prospects associated with the advancement of these distinct sensors for SARS-CoV-2 detection are discussed in detail.

S. R. Benjamin (✉) · T. de Souza Nascimento · G. M. de Andrade
Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, 1127 Coronel Nunes de Melo, Porangabussu, Fortaleza, Ceará-CE 60430-270, Brazil
e-mail: steaje@gmail.com

K. RB Singh
Department of Chemistry, Institute of Science, Banaras Hindu University, Varanasi, Uttar Pradesh 221005, India

C. R. Roque · R. B. Oriá
Department of Morphology, Institute of Biomedicine, Laboratory of the Biology of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, School of Medicine, Federal University of Ceará, 1315 Coronel Nunes de Melo, Fortaleza, Ceará-CE 60430-270, Brazil