



IMPLEMENTAÇÃO DE MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL EM CAMUNDONGOS
E PROPRIEDADES NEUROPROTETORAS DE DERIVADOS
DO ÁCIDO ANACÁRDICO SATURADO

Gilberto A. T. Dalboni de Lima



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Orientadores: Newton Gonçalves de Castro e Jorge Luiz M. Tributino

Rio de Janeiro

Agosto de 2015

" Implementação de Modelo de Isquemia Cerebral em
Camundongos e Propriedades Neuroprotetoras de Derivados do
Ácido Anacárdico Saturado "

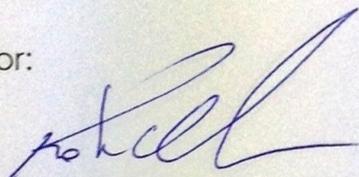
Gilberto Augusto Teixeira Dalboni de Lima

Orientadores:

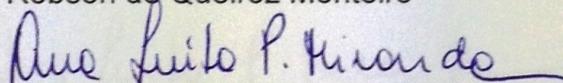
Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro
Prof. Dr. Jorge Luiz Mendonça Tributino

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

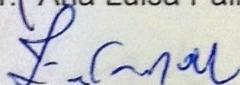
Aprovada por:



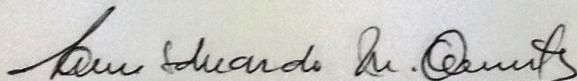
Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro



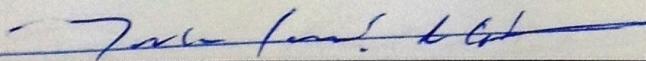
Prof.ª Dr.ª Ana Luisa Palhares de Miranda



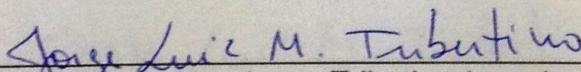
Prof.ª Dr.ª Fernanda Freire Tovar Moll



Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas (Revisor)



Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro (orientador)



Prof. Dr. Jorge Luiz Mendonça Tributino (coorientador)

Rio de Janeiro
19 de agosto de 2015

de Lima, Gilberto Augusto Teixeira Dalboni.

Implementação de Modelo de Isquemia Cerebral em Camundongos e Propriedades Neuroprotetoras de Derivados do Ácido Anacárdico Saturado/ Gilberto Augusto Teixeira Dalboni de Lima. – Rio de Janeiro: UFRJ/ ICB, 2015.

xi, 58f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Newton Gonçalves de Castro e Jorge Luiz Medonça Tributino

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ ICB/ Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2015.

Referências Bibliográficas: f. 58-70.

1. Modelo de Isquemia Cerebral. 2. Acidente Vascular Cerebral. 3. Ácidos Anacárdicos. 4. Neuroproteção. I. Castro, Newton Gonçalves de. Tributino, Jorge Luiz Medonça. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

O amor, afinal, sempre vence a mentira, o ódio, o medo, a idolatria, a loucura.

O amor sempre vence aquilo que torna os homens em escravos.

O amor venceu as falhas humanas, a traição, a tortura.

O amor venceu a morte!

Dedico este trabalho a Deus,
por ter criado-me,
por fortalecer-me, encorajar-me, alegrar-me
e revestir-me de saúde

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que me criou e me sustentou em cada momento da minha vida. Nada eu poderia fazer sem Deus. Ele é crucial na minha vida. Sem Ele nada eu poderia ter conquistado nem ter chegado aonde cheguei. A graça divina me enriqueceu e me resgatou da mediocridade da existência humana. Por enriquecer, quero dizer não a riqueza que se toca, mas a que se vive diariamente. Ela traz, afinal, sentido àquilo que nada pode trazer. Não gostaria de ser genérico, me refiro ao Deus que falou com Abraão há aproximadamente 4.000 anos atrás, ao Deus que veio em carne há aproximadamente 2.000 anos atrás na pessoa de Cristo e ao Deus que habita em nós na pessoa do Espírito Santo. Refiro-me ao Deus Pai, Deus Filho e Deus Espírito Santo.

Agradeço aos meus pais que me educaram e estimularam-me nos meus estudos. A educação que este casal me deu é de suma importância para a minha formação e desenvolvimento como ser humano.

Agradeço aos meus tios Gilberto e Teresa, os quais sempre investiram na minha educação, sempre a valorizaram e contribuíram com seus incentivos e investimentos. Com certeza o apoio deles é muito importante para toda a minha formação educacional.

Agradeço a toda a minha família e amigos pelo apoio, ajuda, orações e paciência.

Agradeço aos professores Newton Castro e Jorge Tributino, que com dedicação e empenho me orientaram no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Farmacologia Molecular (LFM), que me ensinou durante meu estágio e durante o desenvolvimento do trabalho de mestrado.

Agradeço aos trabalhadores do biotério do Departamento de Farmacologia, que me ajudaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os professores, alunos e funcionários que fizeram parte direta ou indiretamente da minha formação no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal.

RESUMO

Implementação de Modelo de Isquemia Cerebral em Camundongos e Propriedades Neuroprotetoras de Derivados do Ácido Anacárdico Saturado

Gilberto A. T. Dalboni de Lima

Orientadores: Newton Gonçalves de Castro e Jorge Luiz M. Tributino

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

O acidente vascular encefálico (AVE) é causado por uma interrupção do suprimento de sangue do encéfalo devido ao rompimento de uma artéria (tipo hemorrágico) ou seu bloqueio por um coágulo (tipo isquêmico, grande maioria dos casos de AVE). O AVE é a segunda maior causa de mortes no mundo. Atualmente, o único tratamento farmacológico para o AVE isquêmico é um trombolítico, que tem um uso limitadíssimo; a alternativa é o desenvolvimento de um fármaco neuroprotetor. Grande parte das isquemias cerebrais ocorre no território da artéria cerebral média (ACM). Para avaliar novos candidatos a fármacos para o AVE, o modelo murino mais recomendado é o de oclusão unilateral da ACM na sua origem. Ácidos anacárdicos insaturados obtidos a partir do líquido da casca da castanha de caju possuem potenciais propriedades neuroprotetoras. Por hidrogenação, obtém-se o ácido anacárdico saturado (LDT11), que, acetilado, gera o derivado LDT13. Implementamos um modelo de isquemia focal por oclusão transitória da ACM em camundongos e avaliamos o potencial efeito neuroprotetor de LDT11 e LDT13. Na avaliação a curto prazo (2 dias), o LDT11 reduziu a mortalidade e preveniu a redução da força dos membros dianteiros; o LDT13 reduziu a mortalidade. Na avaliação a longo prazo (até 28 dias pós-infarto) com um sistema de análise de marcha, encontramos um aumento significativo das áreas das pegadas traseiras dos animais falso-operados em relação aos isquemiados não tratados, mas outros testes seriam necessários para avaliar o efeito do tratamento farmacológico.

Palavras-chave: acidente vascular cerebral, modelo de isquemia cerebral, ácidos anacárdicos, neuroproteção.

Rio de Janeiro
Agosto de 2015

ABSTRACT

Implementation of a Cerebral Ischaemia Model in Mice and Neuroprotective Properties of Saturated Anacardic Acid Derivatives

Gilberto A. T. Dalboni de Lima

Orientadores: Newton Gonçalves de Castro e Jorge Luiz M. Tributino

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Stroke is caused by an interruption of blood supply in the brain due to a arterial rupture (hemorrhagic stroke) or obstruction (ischemic stroke, the most common stroke). Stroke is the second leading cause of deaths in the world. Nowadays, the only pharmacological treatment of ischemic stroke is a trombolitic, which has extremely limited use; the alternative is the development of a neuroprotective drug. Most episodes of cerebral ischaemia occur in the middle cerebral artery (MCA) territory. In order to evaluate new drug candidates for stroke, the most recommended murine model involves unilateral MCA occlusion at its origin. Unsaturated anacardic acids obtained from the cashew nut shell liquid have potential neuroprotective properties. Through hydrogenation, they yield saturated anacardic acid (LDT11), which then yields the acetylated derivative LDT13. Therefore, we implemented a stroke model of transient MCA occlusion in mice and assessed the potential neuroprotective effects of LDT11 and LDT13. In the short term (2 days), LDT11 reduced the mortality and prevented the reduction of forelimb strength; LDT13 only reduced the mortality. In the long term (28 days post-stroke) evaluation of gait impairments, we found a significant increase of hindlimb print area of sham-operated animals when compared to untreated ischemic animals. However, other tests would be required to assess the effect of drug treatment.

Keywords: stroke, cerebral ischemia model, anacardic acids, neuroprotection.

Rio de Janeiro
Agosto de 2015

Sumário

Lista de Abreviaturas	x
Introdução	1
O Acidente Vascular Encefálico	1
A Artéria Cerebral Média e Modelos Experimentais de Acidente Vascular Encefálico	3
Epidemiologia e Fatores de Risco do Acidente Vascular Encefálico	6
Tratamento Farmacológico da Isquemia Cerebral	9
Fisiopatologia da Isquemia e Reperusão Cerebrais	11
O Fator Nuclear κ B e a Neuroproteção	16
Os Ácidos Anacárdicos e suas Atividades Biológicas	20
Objetivos	27
Objetivo Geral	27
Objetivos Específicos	27
Materiais e Métodos	28
Animais	28
Oclusão Intraluminal Transitória da Artéria Cerebral Média	28
Avaliação Neurológica	30
Avaliação do Volume de Infarto	31
Teste de Força de Preensão	33
Análise da Marcha pelo CatWalk	34
Grupos Experimentais e Tratamentos	35
Análises Estatísticas	37
Resultados	38
Avaliação a Curto Prazo	38
Fluxo Sanguíneo Cerebral	38
Massa Corpórea	40

Mortalidade.....	42
Teste de Força de Prensão	42
Escore Neurológico	43
Volume e Localização do Infarto	44
Avaliação a Longo Prazo	47
Fluxo Sanguíneo Cerebral.....	47
Mortalidade.....	48
Análise da Marcha pelo CatWalk.....	49
Discussão.....	51
Conclusões e Perspectivas	57
Referências.....	58
APÊNDICE A – GRÁFICOS DAS ANÁLISES DO SISTEMA <i>CATWALK</i>	71

Lista de Abreviaturas

2-AG	endocanabinóide 2-araquidonoilglicerol
AAsa	ácido anacárdico saturado
AAin	ácidos anacárdicos insaturados
AAS	ácido acetilsalicílico
ACC	artéria carótida comum
ACE	artéria carótida externa
ACI	artéria carótida interna
ACM	artéria cerebral média
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIT	ataque isquêmico transitório
ARA	ácido araquidônico
AVC	acidente vascular cerebral
AVE	acidente vascular encefálico
BHE	barreira hematoencefálica
CB1	receptores canabinóides tipo 1
COXs	cicloxigenases
DATASUS	departamento de informática do sistema único de saúde
DN	danos neurológicos
DPOC	doença pulmonar crônica obstrutiva
EN	escore neurológico
EO	estresse oxidativo
EROs	espécies reativas de oxigênio
FSC	fluxo sanguíneo cerebral
HATs	histona acetiltransferases
ICAM-1	moléculas de adesão intercelular 1
IKK	complexo I κ B-cinase
IL-1	interleucina 1
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
IR	isquemia e reperfusão cerebrais
LCC	líquido da casca da castanha de caju

LDF	fluxômetro Laser Doppler
LOXs	lipoxigenases
LPS	lipopolissacarídeo derivado de patógeno
MN	monofilamento
NF- κ B	fator nuclear κ B
OACM	oclusão intraluminal transitória da artéria cerebral média
OMS	organização mundial de saúde
PPA	artéria pterigopalatina
PU	unidade arbitrária de perfusão
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC	sistema nervoso central
TCF	traumatismo craniano fechado
TF	transdutor de força
TGF β	fator β de transformação do crescimento
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltretrazol

Introdução

O Acidente Vascular Encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma condição neuropatológica de início súbito, que quando limitada somente ao cérebro é denominada de acidente vascular cerebral (AVC). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), é causado por uma interrupção do suprimento de sangue do encéfalo devido ao rompimento de uma artéria – tipo hemorrágico – ou seu bloqueio por um coágulo – tipo isquêmico (OMS, 2013). O AVE isquêmico pode ocorrer de duas formas: no tipo trombótico, um coágulo pode se formar no interior da artéria obstruída; no tipo embólico, um coágulo pode se formar em outro local do corpo e migrar para os vasos do cérebro. Além disso, ele também pode ser causado por fragmentos de tecido desprendido, como as placas ateroscleróticas (A.D.A.M. Medical Encyclopedia, 2013). No Brasil, um estudo de pacientes admitidos na rede hospitalar de Fortaleza mostrou que 72,9% dos AVEs foram do tipo isquêmico, 21,2% foram hemorrágicos, 3% foram ataque isquêmico transitório (AIT) e 2,9% foram de tipo indeterminado (de Carvalho et al., 2011).

Durante o período de interrupção ou redução do fluxo sanguíneo do encéfalo, o suprimento insuficiente de oxigênio e nutrientes desencadeia danos teciduais na região que antes era perfundida pela artéria ocluída ou rompida. Os sintomas mais comuns do AVE são fraquezas ou dormências repentinas de face, braços ou pernas, mais comumente em um lado do corpo. Outros sintomas incluem dificuldades de falar ou de entender a fala, de enxergar e de andar; além de tontura, dor de cabeça, perda de equilíbrio, desmaio e perda da consciência (OMS, 2013). O AVE traz um grande risco de morte e de incapacidade: 60% das pessoas que sofreram AVE morrem ou se tornam dependentes, dependência essa que causa transtornos para família e sociedade (OMS, 2014a).

A isquemia cerebral (ou encefálica) é subdividida em focal e global. No primeiro tipo ocorre redução do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) em um território vascular específico, enquanto que, no segundo tipo, essa redução do FSC abrange todo o cérebro (Harukuni e Bhardwaj, 2006). Uma causa notável e comum da isquemia

global são as paradas cardiorrespiratórias. Neste tipo de isquemia, geralmente ocorre a morte de certas populações neuronais seletivamente vulneráveis no hipocampo, estriado e córtex (Block, 1999; Belayev et al., 2012).

A maioria dos AVEs é do tipo isquêmico e focal e cerca de 80% de todos os AVEs são isquêmicos (Durukan e Tatlisumak, 2007). Com relação ao tempo de isquemia, o AVE isquêmico subdivide-se em transitório e permanente. No transitório, a isquemia permanece por determinado tempo e depois ocorre a reperfusão, esta, por sua vez, pode ser associada a um aumento da injúria no encéfalo (Gu et al., 2012). Na isquemia permanente não há reperfusão súbita.

É importante salientar que a magnitude da redução do FSC e o tempo dessa redução determinam o tamanho do infarto cerebral. Por exemplo, a redução para zero do FSC humano causa morte do tecido nervoso em uma janela de tempo de 4 a 10 minutos; valores de FSC menores que 16 ml/100g de tecido/minuto causam infarto dentro de uma hora, enquanto que valores entre 16 e 20 ml/100g de tecido/minuto não causam infarto, exceto se esse FSC for mantido por horas ou dias. Se o FSC for restaurado antes que ocorra morte celular em quantidade significativa, o paciente pode apresentar sintomas transitórios, que são denominados de AIT (Smith et al., 2004).

A região cerebral afetada pela isquemia é subdivida em duas regiões: núcleo e penumbra (Figura 1A). A primeira corresponde à região do encéfalo irrigada exclusivamente pela artéria ocluída; nela ocorrem rapidamente danos severos e irreversíveis, marcados por necrose de neurônios e de células da glia. A penumbra isquêmica é a área em torno do núcleo e é definida como o tecido isquêmico que foi funcionalmente prejudicado e está em risco de morte, no entanto, esse tecido possui um potencial de ser recuperado pela reperfusão espontânea e/ou por estratégias terapêuticas. Se esse tecido não for recuperado, ele é progressivamente recrutado no núcleo isquêmico, que se expandirá com o tempo para o máximo de volume (Figura 1B; Donnan et al., 2007). A região de penumbra isquêmica é suprida por algum fluxo sanguíneo da circulação colateral e, conseqüentemente, sofre uma injúria menos severa imediatamente após a oclusão. A morte celular nesta região é geralmente do tipo apoptótica e pode progredir por vários dias (Ramos-Cabrer et al., 2011; Ioroi et al., 2013). Portanto, a região de penumbra isquêmica é altamente vulnerável e pode evoluir para uma lesão irreversível em questão de horas. Dessa

forma, o objetivo do tratamento do AVE isquêmico é preservar a maior parte da penumbra que for possível (Belayev et al., 2012).

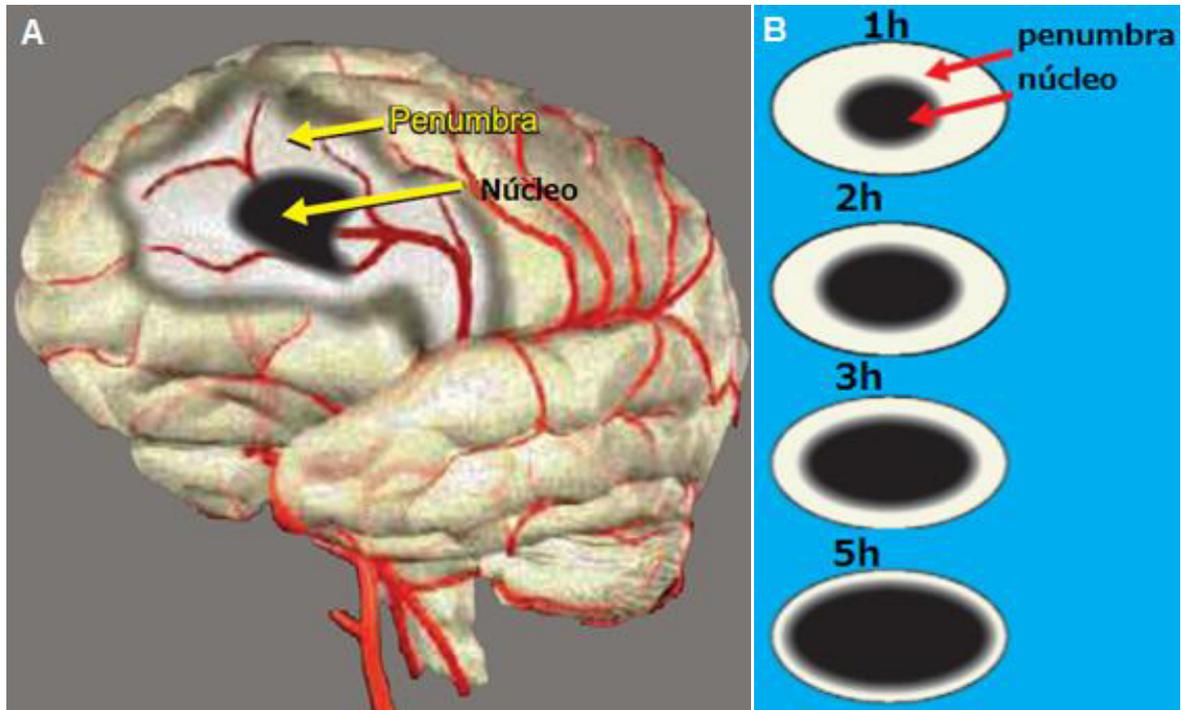


Figura 1: (A) localização do núcleo isquêmico e penumbra; (B) progresso do aumento do núcleo isquêmico com o decorrer do tempo (adaptada de Belayev et al., 2012).

Os efeitos do AVE dependem das regiões do cérebro que sofreram injúria isquêmica e da severidade dessa injúria; por exemplo, um AVE muito severo pode causar morte súbita (OMS, 2013). Não obstante, a maior incidência de AVE isquêmico ocorre pela obstrução da artéria cerebral média (Olsen, 1986); a obstrução dessa artéria foi o foco de estudo desta dissertação.

A Artéria Cerebral Média e Modelos Experimentais de Acidente Vascular Encefálico

A artéria cerebral média (ACM) também é um ramo da artéria carótida interna (ACI) e possui várias ramificações que atingem um grande território, tanto no homem quanto no camundongo (Figura 2; Dorr et al., 2007). É importante salientar que a

ACM fornece sangue para a maior parte do córtex e substância branca do hemisfério (Pare e Kahn, 2012) – toda a face lateral de cada hemisfério é suprida de sangue principalmente pela ACM. Além disso, a maior parte do corpo estriado e da cápsula interna é suprida por ramos proximais dessa artéria (Anon., 1995).

A oclusão proximal da ACM, ao contrário da oclusão distal, abrange as artérias lentículo-estriadas que suprem os gânglios da base; com isso, nessa situação, os gânglios da base sofrem uma isquemia severa. O córtex cerebral apresenta uma redução gradual do FSC, o qual diminui da periferia para o centro do território vascular da ACM, uma vez que os ramos corticais da ACM formam colaterais com territórios vasculares contíguos (Prinz e Endres, 2010).

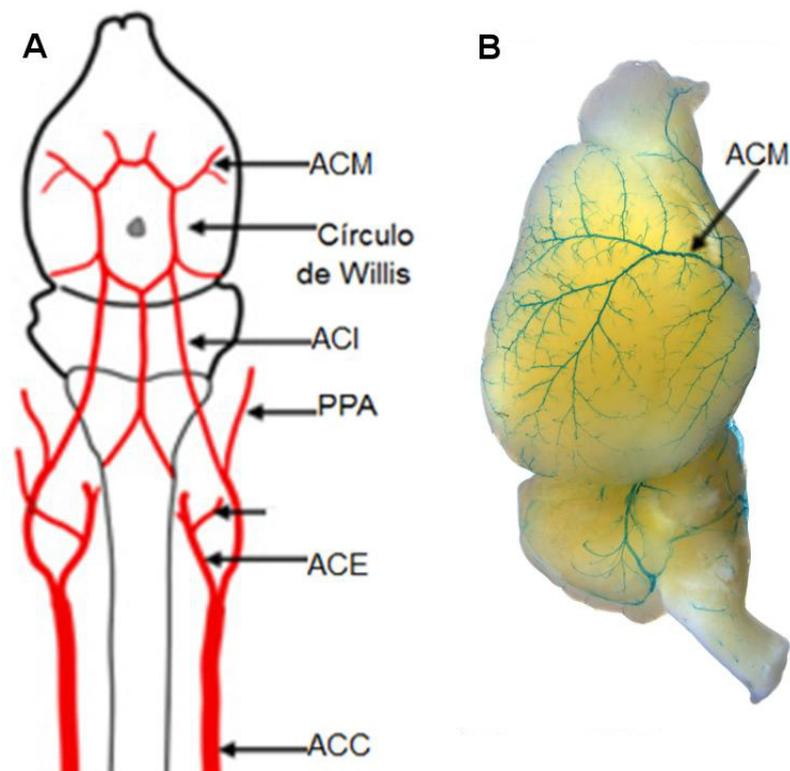


Figura 2: (A) Esquema da anatomia vascular do encéfalo de camundongo em vista inferior ou ventral (esquerda; adaptada de Engel et al., 2011). (B) Vista lateral do encéfalo com marcação arterial por histoquímica de galactosidase (produto azul), de um camundongo expressando o gene repórter LacZ acoplado ao gene WTIP (modificado do catálogo de animais transgênicos KOMP Phenotyping, acessado em 18/07/2015 www.kompphenotype.org/lacz_images/Wtip-H09/BL1346-39/BL1346-39_bra_8x_B.jpg). ACM: artéria cerebral média, ACI: artéria carótida interna, PPA: artéria pterigopalatina, ACE: artéria carótida externa, ACC: artéria carótida comum.

Existem variações da anatomia da ACM humana que são similares às variações que ocorrem em roedores (Wang-Fisher et al., 2008). Além disso, 80% das oclusões da ACM são de origem embólica e nela ocorrem cerca de 1/3 das isquemias cerebrais (Olsen, 1986), sendo uma das maiores artérias que suprem o encéfalo de sangue. Dessa forma, os modelos de isquemia cerebral focal em animais são comumente induzidos via oclusão ou bloqueio da ACM, dada a grande importância dessa artéria em isquemia cerebral (Wang-Fisher, 2009).

É importante ressaltar que quanto mais proximal, ou seja, mais próxima da origem, for a oclusão da ACM, maior será o volume do infarto gerado, porque maior será a área que ficará sem suprimento de sangue; o inverso também é verdadeiro: quanto mais distal for a oclusão, menor será o volume do infarto gerado. Portanto, utilizamos um modelo de oclusão proximal da ACM de camundongos com o objetivo de gerar infartos maiores e, com isso, provocar alterações sensório-motoras avaliáveis a curto e a longo prazos.

O modelo de isquemia e reperfusão focais, por oclusão intraluminal transitória da artéria cerebral média em camundongos (OACM) é o modelo de isquemia cerebral focal mais comumente empregado (Trueman et al., 2011). A oclusão na região proximal da artéria cerebral média (ACM) produz um modelo de AVE com um volume de infarto relativamente grande, bastante adequado para a avaliação a longo prazo de alterações sensório-motoras. No nosso laboratório já fazíamos um modelo de oclusão distal da artéria cerebral média, mas nesse modelo não encontramos sequelas avaliáveis a longo prazo, além de que o volume de infarto era bem pequeno (Elias, 2010; Amorim, 2014; Tributino, 2008), por isso buscamos estabelecer o modelo de oclusão proximal. Este modelo foi descrito originalmente em ratos por Longa e colaboradores (1989) e desde então ele tem sido adaptado para camundongos e tem sido extensamente utilizado por muitos grupos de pesquisadores (Belayev et al., 1996; Linden et al., 2014; Bouet et al., 2007; Chiang et al., 2011; Engel et al., 2011; Kang et al., 2012; Zhou et al., 2013; Costa, 2005). Neste modelo, a oclusão da ACM ocorre na região proximal dessa artéria e é realizada através da inserção de um fio de sutura de monofilamento (MN) recoberto de silicone que atinge a base da ACM no círculo de Willis. A reperfusão ocorre com a retirada do MN, geralmente após cerca de 60 min de oclusão). Em alguns casos, essa reperfusão é semelhante à restauração do fluxo sanguíneo após a lise espontânea de trombo em humanos (Prinz et al., 2013). Para aumentar a

reprodutibilidade do modelo, a medida do grau de obstrução e de reestabelecimento do fluxo sanguíneo deve ser realizada durante o procedimento cirúrgico, por exemplo com um fluxômetro a laser Doppler (Takuwa et al., 2012; Willette et al., 1990; Engel et al., 2011; Kang et al., 2012). Com isso, o fluxo sanguíneo no território cortical irrigado pela ACM é monitorado e pode-se excluir do estudo animais que não atingirem um critério de hipoperfusão.

Um dos principais desafios na translação clínica dos estudos de AVE em animais é a avaliação funcional, que precisa se basear em testes ao mesmo tempo sensíveis e relevantes para a evolução funcional dos pacientes humanos. Nesse sentido, a avaliação de atividade motora espontânea, como a manipulação fina e a marcha. O CatWalk é um sistema de análise quantitativa da marcha de ratos e camundongos, que recentemente começou a ser usado para analisar a marcha após o AVE experimental (Encarnacion et al., 2011; Balkaya et al., 2013; Perkins, 2000). O aparato do CatWalk (Noldus Information Technology, Netherlands) consiste em uma plataforma de vidro de 1,3 m de comprimento iluminada por cima por uma luz vermelha; através do vidro da plataforma passa uma luz verde, de modo que quando o animal pressiona a superfície da plataforma (geralmente com as patas), a luz verde é refletida formando as impressões das pegadas; já a luz vermelha gera a silhueta do corpo do animal. Embaixo da plataforma existe uma câmera que filma as impressões deixadas pelo animal; esses vídeos são utilizados para posterior análises das impressões das patas. O software de análise permite a extração de múltiplos parâmetros quantitativos a partir da identificação semi-automática das pegadas. Nesse trabalho, avaliamos o uso do CatWalk no modelo de oclusão proximal da ACM em camundongos.

Epidemiologia e Fatores de Risco do Acidente Vascular Encefálico

Segundo dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), no Brasil e em 2010, as doenças cerebrovasculares estão entre as cinco principais causas de morte na faixa etária mais produtiva, de 20 a 59 anos. Na região Norte do país, as doenças cerebrovasculares são a terceira maior causa de mortes e, nas outras regiões, elas ocupam a quarta posição no *ranking* de causas de mortes no Brasil (Figura 3; DATASUS, 2010). Incluindo-se a população mais idosa, a mortalidade por doenças cerebrovasculares é ainda maior. Outros dados

epidemiológicos sobre o Brasil mostraram que o número de vítimas fatais por AVE foi de 84.713 em 2000 e de 99.726 em 2010. Em 2012, a doença foi a primeira causa de mortes registradas no país (DATASUS, 2012). Um estudo brasileiro de Carvalho e colaboradores (2011) encontrou que a mortalidade por AVE após a admissão no hospital foi alta: 20,9%. Esses dados epidemiológicos apresentados tornam mais evidente que o AVE impacta de maneira bastante significativa o sistema de saúde do Brasil, ainda mais levando em conta os custos para o tratamento do pacientes incapacitados.

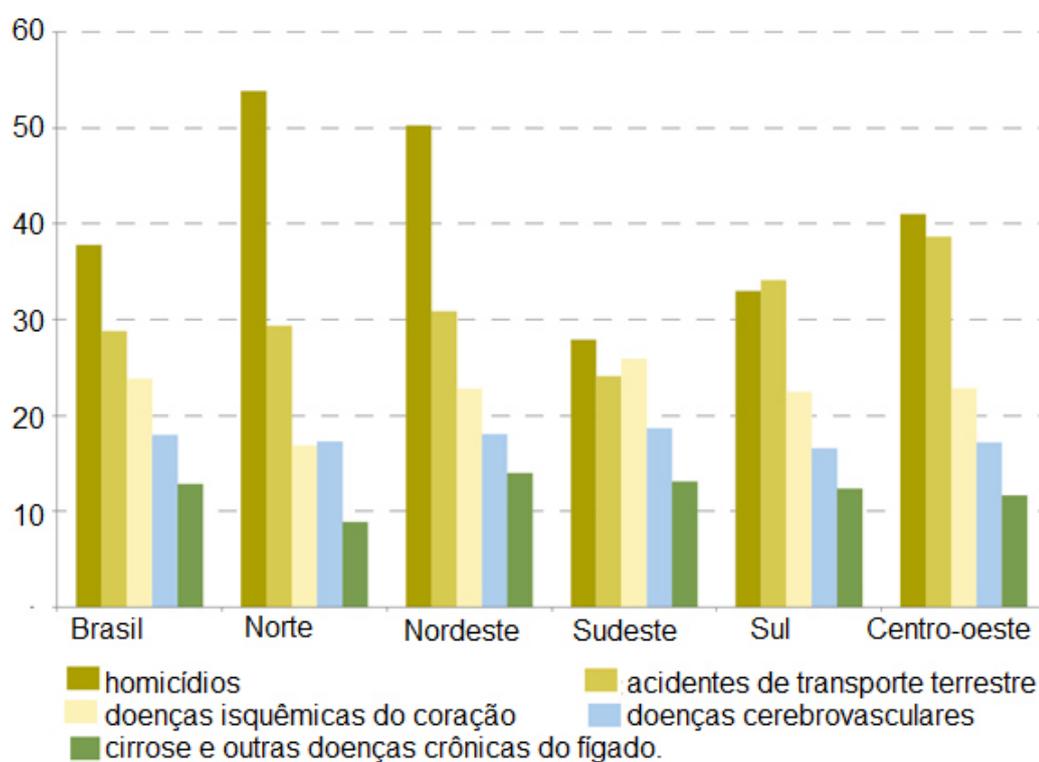


Figura 3: Porcentagens de mortalidades das cinco principais causas de morte no Brasil por regiões na faixa etária de 20 a 59 anos em 2010 (Adaptada de DATASUS, 2010).

Dados epidemiológicos sobre o mundo apresentados pela OMS, mostram que o AVE é a segunda maior causa de mortes no mundo (a primeira são as doenças isquêmicas do coração), correspondendo a 11,9% das mortes (6,7 milhões) em 2012 (Figura 4; OMS, 2014c). A incidência de AVE está diminuindo em muitos países desenvolvidos, no entanto, o número absoluto de pessoas acometidas por essa doença continua a aumentar devido ao envelhecimento da população (OMS, 2014b).

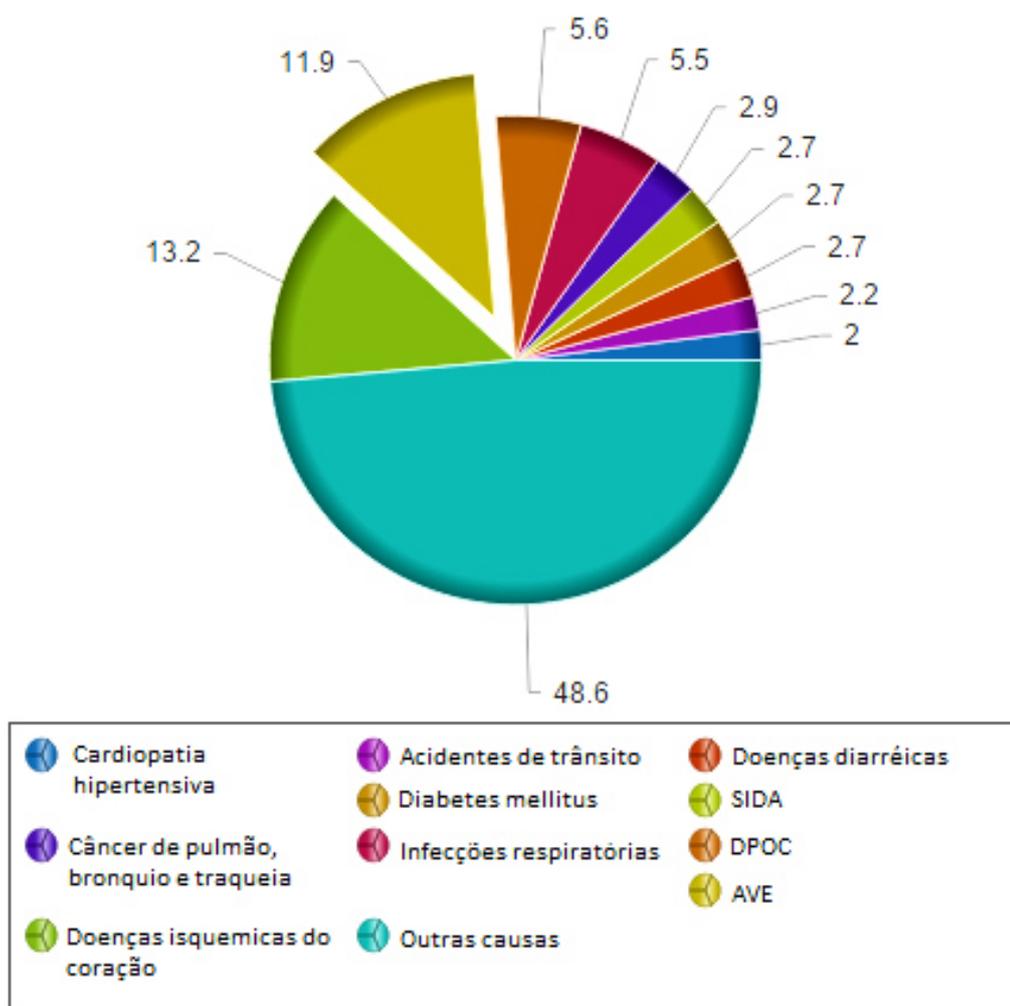


Figura 4: Porcentagem das dez principais causas de morte no mundo em 2012. O AVE é a segunda maior causa de mortes no mundo, representada na fatia em destaque; perde apenas para as doenças isquêmicas do coração. SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida. DPOC: Doença pulmonar crônica obstrutiva (adaptada de OMS, 2014c).

Existem diversos fatores que estão relacionados com a incidência de AVE na população. De acordo com a *Heart & Stroke Foundation* – Fundação do Coração e do Acidente Vascular Encefálico – os fatores de risco são: hipertensão, altos níveis de colesterol sanguíneo, fibrilação atrial, diabetes, massa corporal excessiva, consumo excessivo de álcool, sedentarismo, tabagismo e estresse. Outros fatores importantes são: senilidade, menopausa em mulheres e casos de AVE na família (Heart & Stroke Foundation, 2012). Além disso, problemas de hipertensão durante a gestação podem aumentar dramaticamente o risco de AVE em mulheres (Heart and

Stroke Foundation, 2013). Um dado marcante é que entre as causas mais comuns de mortalidade em pacientes com diabetes de longa duração estão os acidentes cerebrovasculares, além de infarto do miocárdio e insuficiência vascular renal (Frosch et al., 2005).

A prevenção do AVE inclui o tratamento da hipertensão e da hipercolesterolemia, além da inibição de agregação plaquetária (Hsia e Albers, 2005). É importante salientar que o controle da obesidade, do diabetes e do tabagismo é também uma importante forma de prevenção do AVE (Heart & Stroke Foundation, 2012).

Tratamento Farmacológico da Isquemia Cerebral

O AVE é uma emergência médica. As consequências dessa doença são influenciadas pela rapidez e pela qualidade da assistência médica inicial. Esta assistência é melhor realizada por unidades especializadas que possuem as facilidades apropriadas, como, por exemplo, o acesso em até um dia a tomografia computadorizada (Lees, 2002). Neste sentido, é importante ressaltar que entre 25% e 35% dos pacientes acometidos de AVE isquêmico sofrem danos neurológicos (DN) que se iniciam das 48h às 72 h após a ocorrência desse tipo de AVE, sendo que 50% de toda a deterioração clínica ocorrem no primeiro 1 dia. Existe uma grande prevalência de DN em pacientes acometidos pelo AVE isquêmico. Infelizmente, atualmente não existe tratamento capaz de prevenir ou reduzir os impactos desses DN (Serena et al., 2006). No atendimento de emergência ao paciente com suspeita de isquemia cerebral, os DNs devem ser avaliados por um exame neurológico acurado, por exemplo o *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* estabeleceu uma escala de AVE que é muito utilizada (Brott et al., 1989).

O tratamento farmacológico da isquemia cerebral é realizado pela trombólise e pela anticoagulação com aspirina (ácido acetilsalicílico - AAS; Muir, 2013). O objetivo da terapia trombolítica na isquemia cerebral é a lise de um trombo ou êmbolo que está ocluindo uma artéria, com isso haverá redução do volume de dano irreversível ao tecido. Não obstante, a trombólise pode gerar hemorragia cerebral (conversão hemorrágica), que é uma complicação importante, capaz de por fim a todos os benefícios dessa terapia (Gutierrez et al., 2006). As terapias de reperfusão

(como também são conhecidas as trombólises) são feitas com o trombolítico ativador do plasminogênio tecidual recombinante (alteplase, rtPA) em até 4,5 h pós-lesão isquêmica. Essa janela temporal estrita exige uma infraestrutura de atendimento muito eficiente e só é aplicável a alguns pacientes com AVE isquêmico agudo. Portanto, esta categoria de tratamento é limitada a um número muito pequeno de pacientes – a minoria dos pacientes com AVE no mundo (2 a 4%) recebe o tratamento com trombolítico (Molina, 2011); no Brasil, um estudo de Carvalho e colaboradores (2011) em Fortaleza mostrou que apenas 1,1% dos pacientes com AVE isquêmico recebem trombolíticos e o tempo médio entre a admissão no hospital e o neuroimageamento (utilizado no diagnóstico) foi de 3,4 h, o que é um tempo elevado tendo em vista a janela de uso do trombolítico mencionada acima. Ainda segundo esse estudo, a independência funcional após o diagnóstico de AVE foi infrequente (de Carvalho et al., 2011).

O AAS é o único agente antiagregante plaquetário utilizado no tratamento da isquemia cerebral; o tratamento com esse agente se inicia dentro dos primeiros dois dias. O *International Stroke Trial* e o *Chinese Acute Stroke Trial* encontraram que o uso de AAS dentro de dois dias após o AVE reduz minimamente o risco de recorrência e mortalidade dessa doença. Portanto, os estudos mostraram que o uso do AAS no tratamento do AVE isquêmico agudo é seguro, mas produz um benefício líquido pequeno (Smith et al., 2004; Muir, 2013).

Tendo em vista as limitações da terapia de reperfusão e de outros fármacos disponíveis para o tratamento do AVE, a busca de agentes neuroprotetores é essencial. Agentes neuroprotetores são substância que antagonizam, interrompem ou lentificam o progresso de eventos bioquímicos e moleculares que causam danos ao tecido nervoso isquêmico (Ginsberg, 2009). Não obstante o alto impacto da doença, atualmente não existem fármacos neuroprotetores para o tratamento do AVE, daí conclui-se que a necessidade de se descobrir e levar à clínica novos fármacos neuroprotetores é urgente, como vem sendo reiterado pelos painéis de especialistas da área (Albers et al., 2011). Muitos dos fármacos testados como candidatos a neuroprotetores mostraram efeitos na redução dos volumes de infartos em animais, mas não mostraram benefícios em humanos. Um exemplo é o NXY-059, que foi testado como fármaco neuroprotetor para o tratamento do AVE. Este fármaco falhou na fase III de estudo clínico por ineficácia, apesar de toda a evidência pré-clínica favorável (Green, 2008). Um dado muito importante foi

encontrado por O'Collins e colaboradores (2006) que analisaram a literatura no período entre 1957 e 2003. Esses autores identificaram 1026 substâncias que foram avaliadas em modelos animais e *in vitro* como candidatas a fármacos para o tratamento do AVE, sendo que nenhum deles mostrou benefícios em ensaios clínicos. Apesar disso, nos últimos anos foi crescente o número de candidatas a fármacos neuroprotetores para o tratamento do AVE (Minnerup et al., 2012). Portanto, esses dados mostram que existe uma grande dificuldade de translação da pesquisa pré-clínica para a clínica, o que tem resultado nas falhas da abordagem farmacológica para o tratamento do AVE (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable(STAIR), 1999). Segundo Dirnagl (2006), as principais e potenciais razões para essa baixa translação são: diferenças entre espécies, janelas temporais de tratamento inapropriadas, níveis efetivos dos fármacos não atingíveis em humanos devido à toxicidade, uso de animais jovens sem comorbidade, incongruência entre tamanhos dos infartos nos animais experimentais *versus* resultados neurológicos em ensaios clínicos, heterogeneidade de subtipos de AVE em pacientes e falta de poder estatístico em ensaios clínicos, entre outros.

Fisiopatologia da Isquemia e Reperusão Cerebrais

A isquemia e reperusão cerebrais (IR) causam danos aos tecidos do cérebro, o que leva à disfunção desse órgão. Esses danos atingem neurônios, glia e vasos sanguíneos (Ilori et al., 2013). Pelo menos três processos básicos contribuem para a lesão isquêmica no tecido nervoso, assim como no neurotrauma: excitotoxicidade (e sobrecarga de Ca^{2+}), estresse oxidativo e neuroinflamação. Estes processos são interdependentes e contribuem de forma diferenciada ao longo do tempo após o evento isquêmico (Leker e Shohami, 2002).

Na fase inicial do insulto isquêmico, íons sódio e cálcio invadem as células do cérebro e ocorre também liberação de glutamato no ambiente extracelular (Shichita et al., 2012; Iadecola e Anrather, 2011). O glutamato é liberado em grandes quantidades, já na fase inicial da isquemia, a partir da despolarização de neurônios glutamatérgicos. Além de possuir neurotoxicidade direta nos neurônios, o glutamato ativa seus receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e metabotrópicos do grupo I (mGluR1/5), levando ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , Na^+ e Cl^-

(Durukan e Tatlisumak, 2007). Esse mecanismo é denominado de excitotoxicidade induzida por glutamato; estudos mostraram que esse mecanismo é um contribuinte primário para a morte neuronal isquêmica (Lai et al., 2014).

A alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a isquemia e reperfusão gera o estresse oxidativo, que decorre do desequilíbrio entre sistemas endógenos anti-oxidantes e a produção de EROs e pode ser crucial para a sobrevivência ou morte celular devido a disfunções de organelas celulares e a subsequente ativação de moléculas que estão envolvidas em mecanismos de sobrevivência ou morte celular (Nakka et al., 2008). As (EROs) contribuem para o dano cerebral. Elas podem ser produzidas em baixa extensão durante o período de isquemia e são produzidas em muito maior quantidade durante a reperfusão, fase em que ocorre a reintrodução do oxigênio no tecido. Existem diversas fontes de geração de EROs durante a isquemia e reperfusão, como a atividade da óxido nítrico sintase, transporte mitocondrial de elétrons e o metabolismo do ácido araquidônico (ARA). Neste último caso ocorre a produção de superóxido durante a conversão do ARA em eicosanóides pelas enzimas cicloxigenases e 5-lipoxigenase. Outras fontes de radicais de oxigênio são as enzimas P450 e NAD(P)H oxidase. A mitocôndria está entre os primeiros sítios de produção celular de EROs identificados (Belayev et al., 2012; Gwag et al., 2002). As EROs produzidas durante a isquemia e reperfusão ativam plaquetas e células endoteliais, promovendo a formação de trombos. Uma possível consequência desses processos de ativação é a oclusão microvascular (Nakka et al., 2008). O estresse oxidativo reduz os efeitos benéficos do óxido nítrico, o qual é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária e da adesão leucocitária nas células endoteliais. Além disso, o estresse oxidativo e a cascata inflamatória alteram a permeabilidade da barreira hematoencefálica, através da ativação local de metaloproteinases da matriz e da expressão de várias outras proteases. Essa quebra da barreira e o acúmulo de quimiocinas no local aumentam o extravasamento de leucócitos. Estes aderem firmemente ao endotélio ativado através da interação com ICAM-1 expressas no endotélio e integrinas $\beta 2$ leucocitárias (Shichita et al., 2012; Iadecola e Anrather, 2011).

A hipóxia é o disparador inicial da injúria isquêmica, a qual provoca morte celular neuronal e ativação da microglia, que é a população de macrófagos residentes no sistema nervoso central (SNC). A ativação da microglia durante a hipóxia pode ser

causada pela morte neuronal, através da exposição dos sinalizadores de apoptose, ou pela liberação de mediadores inflamatórios associada à condição isquêmica (Belayev et al., 2012).

Os astrócitos, oligodendrócitos, endotélio e pericitos produzem mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), e as proteínas pró-inflamatórias óxido nítrico sintase e metaloproteinases de matriz, em resposta ao estresse celular. Estes mediadores e proteínas contribuem para o disparo da inflamação pós-isquêmica (Shichita et al., 2012). As reações inflamatórias associadas com a injúria provocada pela IR são extremamente críticas para a patogênese do dano tecidual, a qual tem mecanismos semelhantes no cérebro e em outros órgãos. Essas reações são disparadas ao nível da interface entre endotélio e sangue. Os principais mediadores inflamatórios são: citocinas, moléculas de adesão e quimiocinas. As citocinas interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o TNF- α são produzidas por plaquetas, células endoteliais, leucócitos e fibroblastos. As moléculas de adesão medeiam as interações entre os leucócitos e o endotélio. Exemplos de moléculas de adesão são: selectinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (Nakka et al., 2008). Foi sugerido que as selectinas têm sua expressão aumentada nas células endoteliais e nos leucócitos após uma isquemia e reperfusão focais (Huang et al., 2000; Okada et al., 1994). Com isso, ocorre acúmulo de neutrófilos devido ao aumento da transmigração leucocitária no tecido isquêmico, culminando com a neuroinflamação. Esta, por sua vez, é um determinante do dano associado ao infarto no tecido nervoso do encéfalo (Figura 5; Nakka et al., 2008).

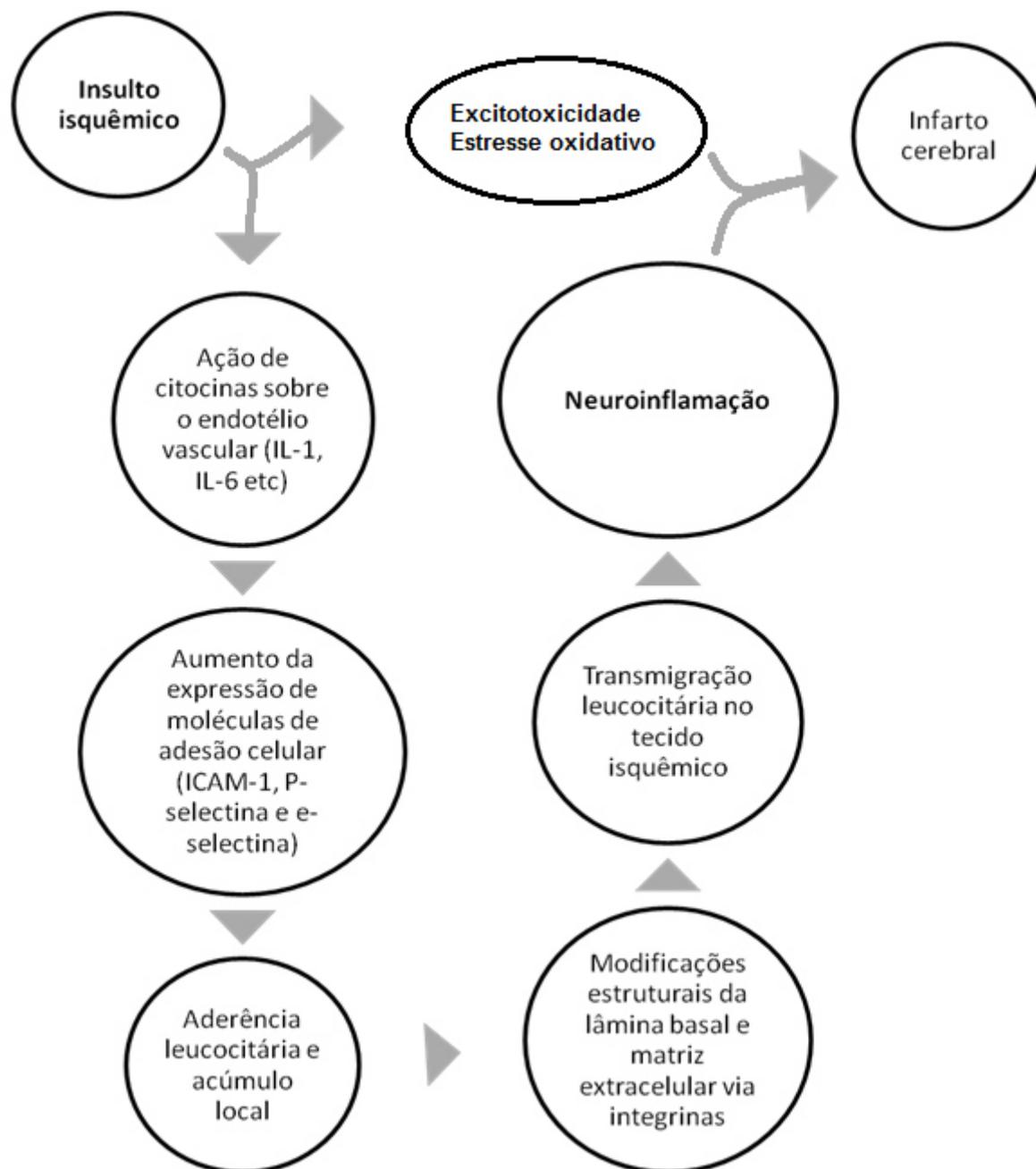


Figura 5: Eventos envolvidos na indução do infarto cerebral após o insulto isquêmico no encéfalo (adaptada de Nakka et al., 2008).

O aumento da expressão e da concentração de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF α e fator β de transformação do crescimento (TGF β) são observados no encéfalo após a isquemia (Belayev et al., 2012). Por exemplo, Feng e colaboradores (2004) encontraram aumento da expressão de IL-1, TNF α e moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) nos córtices dos ratos que sofreram isquemia e reperusão da artéria cerebral média em comparação com os animais que não sofreram a

isquemia. As citocinas são produzidas por células inflamatórias, como macrófagos e microglia, e também por neurônios, astroglia e oligodendroglia. Com o aumento da concentração dessas citocinas, é esperada a ativação da morte celular apoptótica em células vulneráveis. A apoptose isquêmica pode ser induzida por radicais livres de oxigênio, citocinas, insultos metabólicos e alterações na sensibilidade a fatores de crescimento. Todos esses indutores podem resultar de dano excitotóxico aos sistemas intracelulares, como o citoesqueleto, transporte axonal e mitocôndria (Belayev et al., 2012).

A neuroinflamação gerada na região de núcleo isquêmico se propaga para a região de penumbra em poucas horas. Existem diversas cascatas de mecanismos moleculares disparados pela isquemia cerebral que podem contribuir para essa transformação da penumbra em tecido danificado irreversivelmente (núcleo isquêmico). Sinteticamente, a redução do FSC leva a uma depleção do ATP com consequente falha da bomba de Na^+/K^+ e aumento do glutamato extracelular, por exocitose vesicular ou reversão de transportadores. Como visto anteriormente, o glutamato ativa os canais NMDA e AMPA e resulta no aumento intracelular de cálcio, que, por sua vez, participa da formação de radicais livres através da ativação da enzima óxido nítrico sintase. A inibição desta enzima está relacionada com a redução do volume de infarto em modelos experimentais de isquemia cerebral. A difusão do glutamato do núcleo isquêmico para a lesão periférica também participa dos mecanismos de danos irreversíveis na penumbra, uma vez que o glutamato medeia a despolarização da região de peri-infarto. Essa despolarização se origina no núcleo isquêmico e se propaga para a periferia da lesão, provocando aumento do volume de infarto (Figura 6; Castellanos et al., 2006).

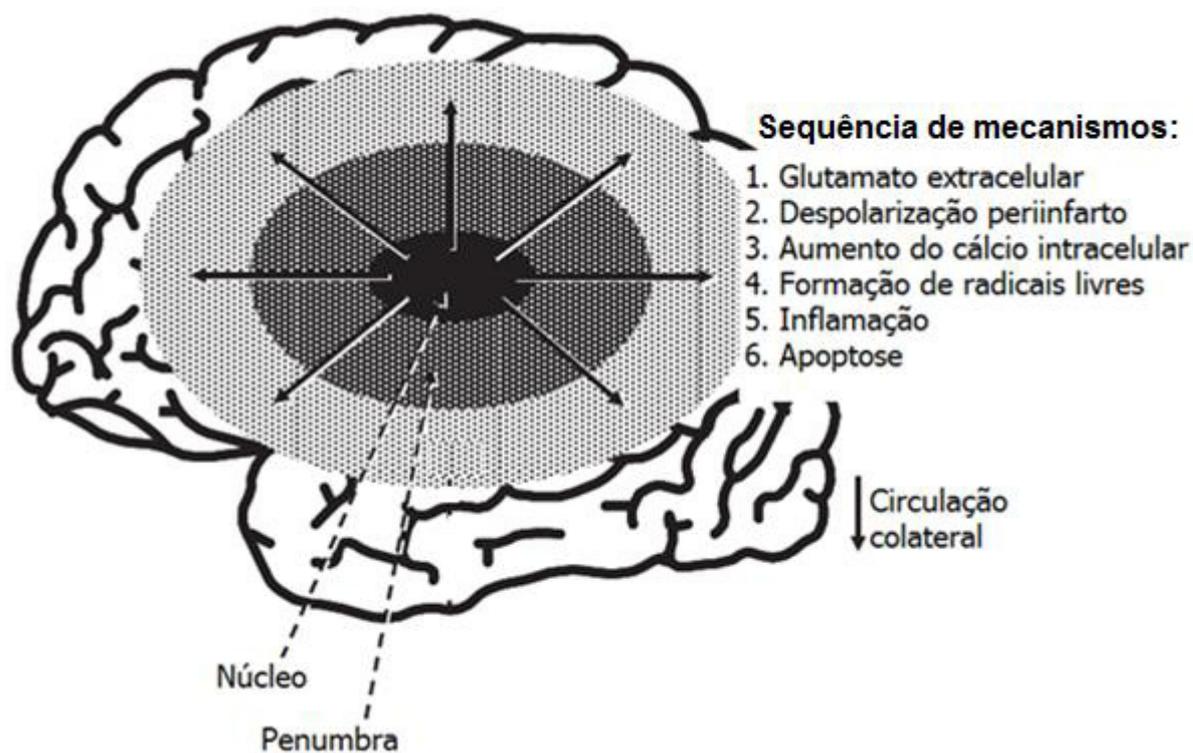


Figura 6: Mecanismos moleculares relacionados com a transformação da penumbra em tecido danificado irreversivelmente – núcleo isquêmico (adaptada de Castellanos et al., 2006).

No processo inflamatório decorrente da isquemia cerebral, o fator nuclear κB , que é um fator de transcrição, é ativado e desempenha um papel muito importante na neuroinflamação decorrente da IR. O processo de sinalização envolvido com esse fator e sua importância nos processos neuroinflamatórios está exposto no tópico seguinte.

O Fator Nuclear κB e a Neuroproteção

O fator nuclear κB (NF- κB) é um fator de transcrição induzível que desempenha um papel crucial na expressão de diversos genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias e na sobrevivência celular (Ghizzoni et al., 2011); essas respostas fazem parte das reações a infecções ou a lesões e ajudam a proteger os organismos (Alberts et al., 2008b). Esse fator é talvez o mais importante fator de transcrição que induz a transcrição de genes pró-inflamatórios (Gu et al., 2012). Além disso, ele é largamente expresso no SNC (Munhoz et al., 2008). Cinco proteínas NF- κB formam

homo e heterodímeros, cada um desses dímeros ativa um grupo específico de genes (Alberts et al., 2008b). O complexo de proteínas NF- κ B mais prevalente e melhor estudado é o heterodímero p50-p65 (Ghizzoni et al., 2011).

Estímulos pró-inflamatórios, como LPS (lipopolissacarídeo derivado de patógeno) e citocinas TNF α e IL-1 β , são indutores do NF- κ B em muitos tipos celulares. Os receptores do tipo Toll, de IL-1 β e de TNF α atuam de forma semelhante na ativação do NF- κ B, o qual, por sua vez, ativa centenas de genes que participam das respostas imunes inflamatórias e inatas (Alberts et al., 2008b). A Figura 7 descreve a sinalização celular mediada pelo NF- κ B, quando induzido pelo TNF α , o que representa a via canônica de ativação. O trímero de TNF α se liga ao receptor de TNF α . Essa ligação induz a fosforilação da subunidade β do complexo I κ B-cinase (IKK), ativando-o. O complexo IKK ativado fosforila I κ B, que são proteínas inibidoras do NF- κ B. Esta fosforilação induz a ubiquitinação e consequente degradação nos proteassomos de I κ B fosforilado. Com a degradação de I κ B, o NF- κ B é ativado e translocado do citoplasma para o núcleo celular e, com o auxílio de proteínas coativadoras, ativa a transcrição de genes alvo (Hoffmann e Baltimore, 2006).

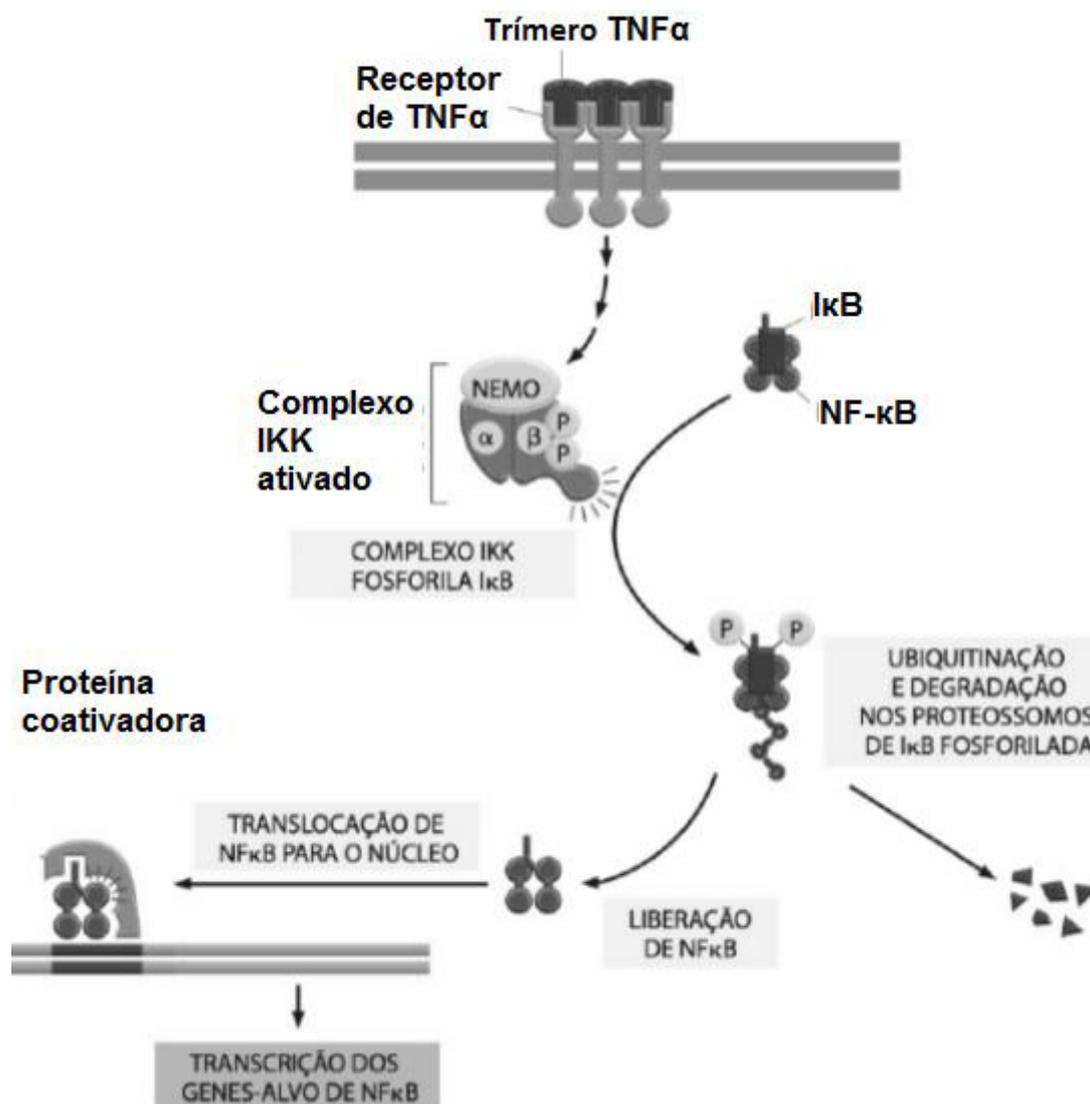


Figura 7: Regulação do fator nuclear κ B mediado pelo receptor de TNF α (adaptada de Alberts et al., 2008b).

Diversas evidências sustentam a premissa de que a ativação de NF- κ B contribui para a injúria neuronal induzida pela isquemia cerebral (Gu et al., 2012). A injúria, por sua vez, desencadeia o aumento da produção de citocinas que ativam o NF- κ B. Esse fator induz a expressão de genes como óxido nítrico sintase, IL-6, IL-1 β , TNF α , ICAM-1 e ciclo-oxigenase-2 (Chen et al., 2012), que são fatores relacionados com o desenvolvimento do processo inflamatório. Feng e colaboradores (2004) encontraram um aumento de translocação de NF- κ B do citoplasma para o núcleo celular em modelo de IR da ACM de ratos. Portanto, a indução do NF- κ B desempenha um papel essencial nas respostas inflamatórias decorrentes do AVE

(Chen et al., 2012). Ademais, a inibição desse fator foi descrita como detentora de atividade neuroprotetora, como descrito adiante.

A via do NF- κ B tem sido reconhecida como alvo para a intervenção terapêutica (Ghizzoni et al., 2011). Como esse fator é um dos principais da resposta inflamatória, é provável que o papel deletério do NF- κ B nas doenças inflamatórias resulte de defeitos na regulação da sua ativação (Perkins, 2000; Karin e Ben-Neriah, 2000). No tecido neural, mesmo sem influência da resposta imune sistêmica, a inibição do NF- κ B tem atividade neuroprotetora, como mostrado em modelos *in vitro* de lesão neural (Zou e Crews, 2005). Mayne e colaboradores (2001) demonstraram uma redução do dano encefálico em um modelo de AVE hemorrágico em ratos após a inibição da via do TNF α . Essa atividade neuroprotetora também foi mostrada em estudos de Panikashvili e colaboradores (2005) que exploraram o efeito do endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) na transativação de NF- κ B após um traumatismo craniano fechado (TCF) em camundongos. Os animais controles que sofreram o TCF tiveram um aumento significativo de NF- κ B ligado ao ácido desoxirribonucleico (ADN) em comparação com os animais falso-operados. O tratamento, com 2-AG, dos animais que sofreram TCF, aboliu completamente esse aumento de NF- κ B ligado ao ADN. Esse grupo de pesquisadores concluiu que o 2-AG exerce neuroproteção após uma injúria cerebral traumática, pelo menos em parte, via inibição da transativação de NF- κ B através de receptores canabinoides tipo 1 (CB1; Panikashvili et al., 2005). Zou e colaboradores (2005) encontraram que a inibição de NF- κ B com o peptídeo PTD-p65-P1 bloqueia a potencialização por TNF α da morte neuronal induzida por glutamato em culturas de fatias de hipocampo. Eles também sugeriram que a elevação no encéfalo de glutamato e de TNF α promove neurotoxicidade sinérgica. Portanto, os achados desse último grupo de pesquisadores sugerem que o TNF α e o glutamato interagem para aumentar a morte neuronal e que os antagonistas do NF- κ B poderiam ser considerados como agentes terapêuticos em uma variedade de doenças neurodegenerativas associadas com o estresse oxidativo e com o aumento de TNF α e glutamato (Zou e Crews, 2005). Outro exemplo, é que a inibição do NF- κ B parece mediar o efeito neuroprotetor do ginkgolídeo B contra o dano no encéfalo induzido pela isquemia intraluminal, focal e transitória da ACM de camundongos (Gu et al., 2012).

Os Ácidos Anacárdicos e suas Atividades Biológicas

O caju é obtido do cajueiro *Anacardium occidentale* Linn, que é uma planta nativa do Brasil (Figura 8A-B). Ele é constituído por um pedúnculo (pseudofruto) e pela castanha (fruto verdadeiro; Figura 8B). Da castanha do caju obtem-se a amêndoa de castanha do caju, que é o produto nobre do cultivo, e o líquido da casca da castanha de caju (LCC; Pessoa e Leite, 2013), que constitui 25% da massa da castanha do caju (Oliveira et al., 2011). A casca da castanha do caju pode ser fonte de combustível nas próprias fábricas de processamento da castanha (Pessoa e Leite, 2013). A cultura do caju é uma das principais atividades socioeconômicas do nordeste brasileiro; nesta região, ocorre a maior produção de castanha de caju do país (Oliveira et al., 2011). Além disso, o agronegócio dessa castanha no Brasil representa uma parcela significativa da economia (Gonzaga, 2008).



Figura 8: (A) cajueiro – *Anacardium occidentale*. (B) caju (adaptada de Gonzaga, 2008).

O LCC é um subproduto de agronegócio do caju de valor agregado muito baixo. No entanto, é uma das principais fontes de lipídios fenólicos não-isoprenóides de origem natural, constituído principalmente de ácidos anacárdicos, cardanol, cardol e 2-metilcardol. Esse líquido possui muitas aplicações na química fina, a principal é na produção de polímeros e resinas (Mazzetto et al., 2009). Os ácidos anacárdicos insaturados (AAin) são abundantes no LCC (Figura 9A-C). Através de hidrogenação

catalítica é produzido o ácido anacárdico saturado (AAsa) a partir dos AAsa extraídos do óleo da casca da castanha (Figura 9D).

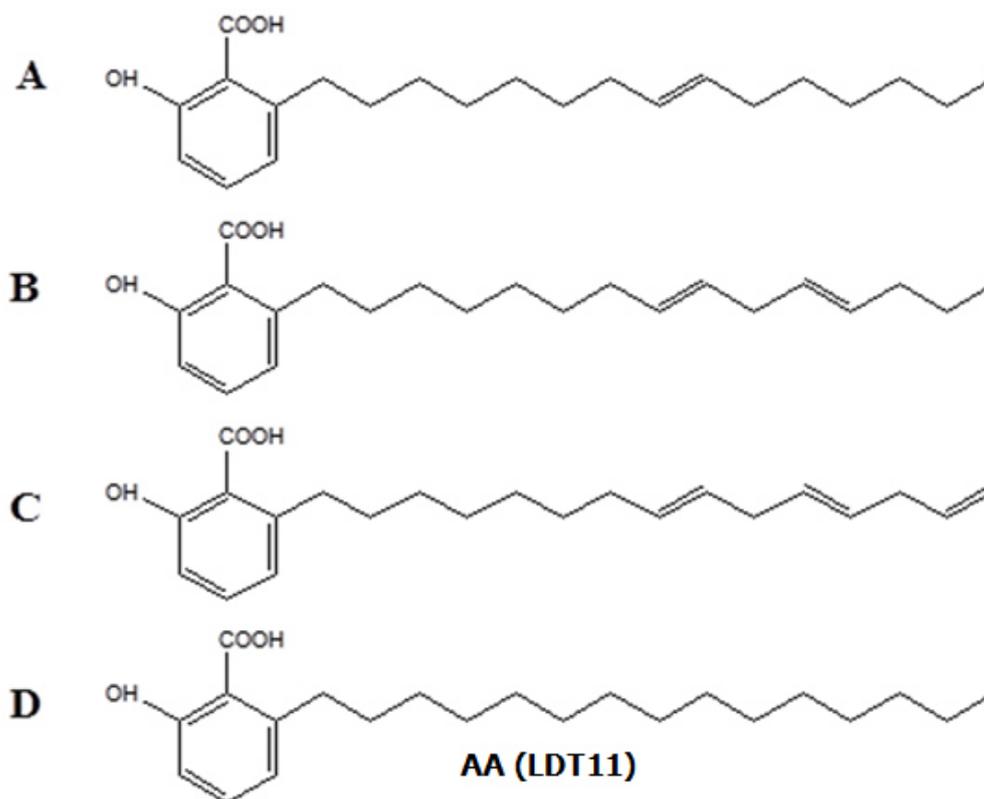


Figura 9: Estrutura dos ácidos anacárdicos. (A-C) Ácidos anacárdicos insaturados (extraídos do óleo da casca da castanha do caju). (D) Ácido anacárdico saturado obtido por hidrogenação dos ácidos anacárdicos insaturados, que foi denominado de LDT11.

Os ácidos anacárdicos são análogos do ácido 2-hidroxibenzoico, ou ácido salicílico. Os salicilatos e especialmente o ácido acetilsalicílico (AAS) são importantes fármacos anti-inflamatórios não esteroidais clássicos, conhecidos por inibir as COX, mas também já foi mostrado seu efeito direto na ativação do NFκB (Yin et al., 1998). O grupo do professor Luiz A. S. Romeiro da Universidade de Brasília – UNB – propôs alterações no AAsa com o objetivo de mimetizar o ácido acetilsalicílico (AAS; Figura 10A). Esse grupo de pesquisadores obteve o AAsa a partir do LCC, denominando esse produto inicial de LDT11 (Figura 9D), e adicionou o grupamento acetila ao grupamento fenólico do AAsa, gerando o derivado acetilado LDT13 (Figura 10B). Portanto, o derivado LDT13 talvez possua uma atividade

aprimorada de inibição das COXs e do NFκB, visto que esse derivado acetilado mimetiza o AAS.

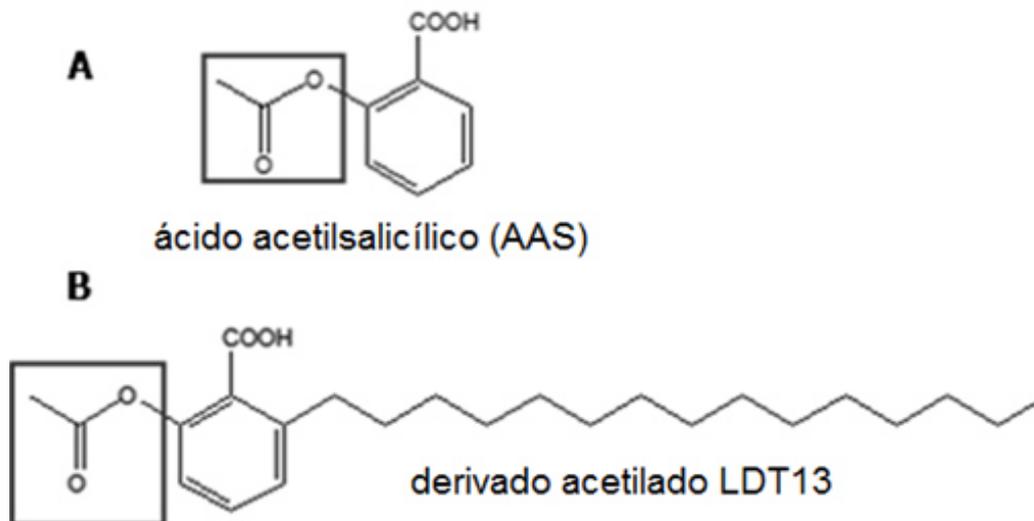


Figura 10: (A) Estrutura do ácido acetilsalicílico. (B) Derivado semi-sintético do ácido anacárdico saturado, apresentando o grupamento acetila em destaque, presente na posição 2, como no no ácido acetilsalicílico.

Os AAsa estão entre os lipídios fenólicos mais estudados em relação à atividade biológica (Gonzaga, 2008). Destacam-se dessas atividades: inibição do NF-κB, antioxidação e inibição das enzimas lipoxigenase, ciclooxygenase e histona acetiltransferase.

Sung e colaboradores (2008) testaram a hipótese de que os AAsa podem mediar seus efeitos através da modulação da via do NF-κB. Os resultados demonstraram que os AAsa podem suprimir a ativação do NF-κB por citocinas, fatores de crescimento e promotores tumorais através da inibição da fosforilação e degradação dependente de TNF da subunidade inibitória da NF-κB cinase (IκBα), consequentemente levando à supressão de produtos de genes regulados por NF-κB. Os resultados demonstraram que os AAsa são potentes inibidores da ativação do NF-κB, o que pode explicar os seguintes efeitos dos AAsa: antiangiogênico, antiproliferativo, antimetastático, anti-inflamatório e imunomodulador. O grupo encontrou que os AAsa suprimem a ativação de NF-κB induzida por TNF em uma maneira dose e tempo-dependente. Além disso, os AAsa não modificam a habilidade de ligação ao ADN do complexo do NF-κB, portanto os AAsa inibem a ativação de

NF- κ B indiretamente – inibem a fosforilação e a degradação de I κ B dependente de TNF (Sung et al., 2008). Assim, os AAsa e derivados avaliados suprimem o NF- κ B (que é ativado por carcinógenos, fatores de crescimento e estímulos inflamatórios) via inibição da ativação de IKK, fosforilação e degradação de I κ B, fosforilação da subunidade p65 de NF- κ B (Figura 11; Hemshekhar et al., 2011). Como descrito na seção anterior, a inibição do NF- κ B pode conferir uma potencial atividade neuroprotetora. Podemos, então, propor a hipótese de que os AAsa possuem potencial atividade neuroprotetora via inibição do NF- κ B.

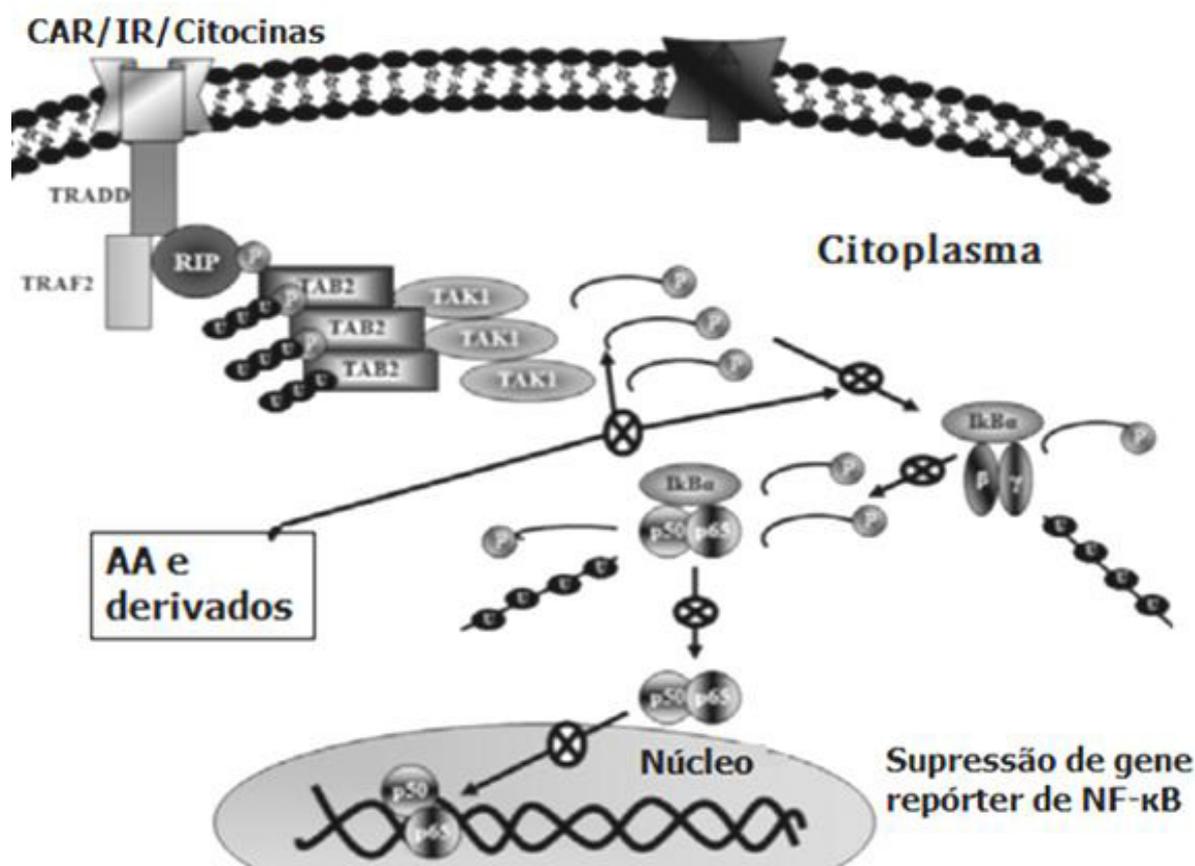


Figura 11: Mecanismos propostos de ação dos AAsa e de seus derivados na supressão de gene repórter de NF- κ B. CAR: carcinógeno; IR: resposta inflamatória (adaptada de Hemshekhar et al., 2011).

Os AAsa agem como antioxidantes de várias formas, inclusive indiretamente, através da inibição de várias enzimas pró-oxidantes, que participam da produção de EROs. Atuam como quelantes de íons de metais divalentes como Fe^{2+} e Cu^{2+} , que

participam das reações de Fenton, mas não eliminam os EROs diretamente (Kubo et al., 2006). Masuoka e colaboradores (2004) encontraram que os ácidos anacárdicos inibem a geração do ânion superóxido pela enzima xantina oxidase, portanto os AAsa previnem efetivamente o dano celular induzido pelo H_2O_2 , que pode ser convertido a EROs – radicais hidroxil – na presença de íons de metal, pelas reações de Fenton (Hemshkhar et al., 2011). Oliveira e colaboradores (2011) avaliaram a propriedade anti radical livre dos constituintes do LCC. Eles encontraram que esses constituintes, entre eles os AAsa, apresentaram atividades antioxidantes (Oliveira et al., 2011).

A atividade antioxidante está associada com a neuroproteção, como demonstrado por muitos estudos em modelos *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, Chen e colaboradores (2011) encontraram que a potente atividade antioxidante de 7,8-dihidroflavona é neuroprotetora em modelo de cultura de células HT-22. Ribeiro e colaboradores (2013) mostraram que a atividade antioxidante de probucol também é neuroprotetora em modelo de doença de Parkinson em camundongos. Zhang e colaboradores (2013) mostraram que, entre outras atividades da luteolina, a atividade antioxidante contribui para o efeito neuroprotetor em modelo de AVE por oclusão focal, intraluminal e transitória da artéria cerebral média (ACM) de ratos. Portanto, a atividade antioxidante dos AAsa também corrobora a hipótese de que tenham potencial atividade neuroprotetora para o tratamento da isquemia cerebral.

A ciclooxigenase 1 e a ciclooxigenase 2 (COX-1 e COX-2, respectivamente) são algumas das enzimas oxigenadoras que no processo inflamatório participam do metabolismo através da conversão do ARA em uma variedade de eicosanóides. No encéfalo, as duas isoformas, COX-1 e COX-2, são constitutivamente expressas, mas em locais específicos. Os estímulos inflamatórios provocam a ativação da microglia e a liberação de ARA pelos neutrófilos infiltrados. Esses ARAs são rapidamente convertidos a prostaglandinas (PGE2 e PGD2) em reações catalisadas pelas enzimas COX-1 e COX-2. A ativação dos receptores pelas prostaglandinas está associada aos eventos iniciais da inflamação, como, por exemplo, dor, febre, edema e rubor. A COX-1 é principalmente expressa em microglia e a COX-2 existe nos dendritos neuronais e terminais excitatórios. Devido à expressão da COX-1 na microglia, essa enzima emergiu como dominante na literatura que diz respeito à neuroinflamação e à neurodegeneração (Bazan et al., 2012). A inibição da COX-2 foi descrita como possuindo atividade neuroprotetora; por exemplo, Abraki e

colaboradores (2013) encontraram que a administração ao mesmo tempo de inibidor seletivo de COX-2 e de um ligante do receptor PPAR- γ em cultura de células possui efeitos neuroprotetores iguais ao que ocorrem quando na administração separada. Teismann e Ferger (2001) mostraram que a inibição de COX-1 e COX-2 pelo ácido acetilsalicílico (AAS) ou preferencialmente de COX-2 por meloxicam promovem neuroproteção no estriado e na substância negra contra toxicidade de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) em modelo de doença de Parkinson em camundongos. Ahmad e colaboradores (2009) encontraram que o tratamento com valdecoxib (inibidor seletivo de COX-2) após indução de isquemia focal transitória da ACM de ratos tem um efeito de redução do volume de infarto. Esse tratamento também reduziu as concentrações de prostaglandinas E_2 na penumbra isquêmica cortical. Portanto, os resultados deste último grupo sugerem que a inibição de COX-2 com valdecoxib promove neuroproteção em modelo de oclusão transitória da ACM (Ahmad et al., 2009).

As lipoxigenases (LOXs) constituem uma família de dioxigenases que é largamente distribuída nos reinos animal e vegetal. As LOXs catalisam a oxigenação de ácidos graxos poli-insaturados em correspondentes hidroperóxidos conjugados (Ha 2005). A super-expressão de algumas LOXs foi descrita em diversas doenças inflamatórias (Wisastra et al., 2013), portanto essas enzimas são de grande importância nas condições de inflamação. A 12/15-LOX contribui para a morte celular neuronal e dano vascular decorrente de isquemia cerebral. A inibição dessa LOX pode promover proteção multifatorial contra o dano isquêmico (van Leyen K., 2013). Foi isso que Yigitkanli e colaboradores (2013) observaram em modelo de isquemia focal transitória da ACM de camundongos. Shi e colaboradores (2013) também mostraram que a inibição da LOX-5 pelo zileuton reduz o dano cerebral e a morte neuronal apoptótica induzidos pela oclusão intraluminal e permanente da ACM de ratos.

O AAsa possui atividade de inibição de lipoxigenase humana h-5-LOX e de COX-2 (Wisastra et al., 2013). Grazzini e colaboradores (1991) encontraram a inibição de LOX de tubérculo de batata e de COX-2 de ovelha pelos AAsa e AAin. Além disso, os AAsa e AAin são inibidores de LOX de soja (Ha e Kubo, 2005). Kim e colaboradores (2013) encontraram que os AAsa reduzem a indução da expressão de COX-2 na pele por raios UV em camundongos. Portanto, os AAsa também poderiam ter atividade neuroprotetora via inibição de COXs e de LOXs.

Os AAsa são inibidores da histona acetiltransferase (HATs; Ghizzoni et al., 2011); eles inibem a atividade de HAT induzida por TNF (Sung et al., 2008). As HATs são um grupo de enzimas que desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica: elas modificam covalentemente os resíduos de lisina da porção N-terminal das histonas através da adição de grupos acetila da acetil-CoA (Balasubramanyam et al., 2003). Essas modificações tornam o ADN acessível à maquinaria de transcrição (Carlberg e Molnár, 2014). As histonas são um grupo de pequenas proteínas, ricas em arginina e lisina. Elas formam a região central dos nucleossomos. Nos cromossomos eucarióticos, o ADN se enrola ao redor dos nucleossomos (Alberts et al., 2008a). Portanto, as modificações provocadas pelas HATs tornam o ADN acessível à maquinaria de transcrição (Carlberg e Molnár, 2014). Outra atividade da HAT é a acetilação da subunidade p65 do NF- κ B; essa acetilação, que é uma modificação pós traducional, regula a função nuclear desse fator de transcrição (Seong et al., 2011). Como visto anteriormente, a inibição do NF- κ B está associada com a neuroproteção. Portanto, a inibição da HAT está associada com um efeito anti-inflamatório via hipo-acetilação do NF- κ B (Seong et al., 2011). Yildirim e colaboradores (2014) observaram que a inibição de atividade de HAT da proteína de ligação a CREB (proteína ligadora a elemento resposta do AMPc) atenua o pré-condicionamento isquêmico neuronal. Eles concluíram que os níveis de CREB e de acetilação de histonas determinam a consequência do AVE e está associada com a indução do estado de resistência após a isquemia.

Em resumo, o ácido anacárdico saturado (AAsa; LDT11) e seu derivado acetilado LDT13 possuem propriedades relevantes para um efeito anti-inflamatório e neuroprotetor, através de antioxidação e inibição de NF- κ B, COXs, LOXs e HATs. Assim, neste estudo, avaliamos a potencial atividade neuroprotetora *in vivo* do LDT11 e do LDT13 no modelo de oclusão intraluminal, focal e transitória da artéria cerebral média em camundongos.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliação do potencial efeito neuroprotetor do ácido anacárdico saturado (LDT11) e de seu derivado acetilado (LDT13) em modelo de isquemia intraluminal, focal e transitória da artéria cerebral média em camundongos.

Objetivos Específicos

Implementação, otimização e validação do método de indução de isquemia e reperfusão focais, por oclusão intraluminal transitória da artéria cerebral média em camundongos, com fluxometria per-operatória.

Implementação e validação do método de avaliação da função sensório-motora pós-lesão por análise automática de marcha a partir do imageamento das pegadas em camundongos.

Avaliação do potencial efeito neuroprotetor do ácido anacárdico saturado (LDT11) e de seu derivado acetilado (LDT13) quanto ao volume de infarto e às alterações sensório-motoras no modelo de isquemia e reperfusão.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos (24-33 g) obtidos dos biotérios do Instituto de Microbiologia e da Faculdade de Farmácia da UFRJ e do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os animais foram mantidos no Biotério dos Programas de Farmacologia, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFRJ, obedecendo às normas internacionais de cuidados, com água e ração à vontade, em ambiente a 22-25°C com luzes acesas das 6:00 às 18:00 h. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CCS, UFRJ, atendendo pelo número do protocolo DFBCICB029. Para a medida da massa corpórea, os animais foram pesados em balança e as medidas registradas em gramas.

Oclusão Intraluminal Transitória da Artéria Cerebral Média

Os camundongos foram anestesiados por via inalatória com auxílio de máscara com uma mistura de isoflurano e O₂ obtida com um vaporizador universal (Takaoka, BR). Durante todo o procedimento cirúrgico, a temperatura do animal foi mantida a aproximadamente 37°C com o uso de uma placa aquecida. O fluxo sanguíneo cortical no território da ACM foi registrado continuamente através do crânio intacto pelo fluxômetro *Laser Doppler* (LDF) moorVMS (Moor Instruments, RU), com o auxílio de um sistema de digitalização MP100 controlado pelo programa *AcqKnowledge* (BIOPAC Systems, Inc). Após uma pequena incisão na pele na linha média do crânio, a ponta da sonda de fibra óptica P10d do LDF foi colada no osso parietal do animal no início da cirurgia com o auxílio de um suporte de silicone de moldagem dentária, retirada após a oclusão e recolocada imediatamente antes da retirada do MN para registro da reperusão. As coordenadas do local no qual a sonda foi colada foram: 1-2 mm posterior e 3 mm lateral em relação ao bregma (Wang-Fisher et al., 2008; Takamiya et al., 2012). Após a afixação da sonda, o animal foi colocado em posição supina. Então foi feita uma incisão na linha média na

região ventral do pescoço e os tecidos foram rebatidos. Os procedimentos foram feitos no lado esquerdo do animal e todas as ligaduras foram feitas com fios suturas 5/0 ou 6/0. A artéria carótida comum (ACC) foi dissecada cuidadosamente e foi feita uma ligadura nessa artéria; da mesma forma foi feito com a artéria carótida externa (ACE) e com a artéria carótida interna (ACI). As suturas da ACC e da ACE foram ancoradas fora do corpo do animal de modo a tornar mais superficiais essas artérias e permitir melhor visualização e manipulação. Ainda outra sutura na ACC foi feita mais próxima da bifurcação ACE-ACI. Foi feita uma pequena incisão na ACC entre as duas suturas e foi introduzido gentilmente nesse corte um filamento de nylon 7.0 210 μm (*MCAO suture 7021910PK5Re* Doccol Corp., EUA), previamente esterilizado por imersão em etanol 70%. O comprimento – desde a bifurcação entre ACE e ACI – do MN introduzido na ACI foi de aproximadamente 8 mm. Esse MN foi direcionado para a ACI com o auxílio de pinça de modo a evitar a entrada na artéria pterigopalatina (Figura 12). Monitorando o fluxo sanguíneo, continuava-se cuidadosamente a inserção do MN pela ACI até atingir a origem da ACM no círculo de Willis, indicada pela queda do fluxo. Os animais com 70% ou mais de redução de fluxo foram incluídos nos experimentos (Wong et al., 2014). A ligadura na ACI foi, então, apertada para fixar o filamento na posição de oclusão durante os 60 min ou 40 min de isquemia. Após esses procedimentos, foi aplicada lidocaína 2% topicamente na incisão do pescoço e da cabeça do camundongo e 0,5 ml de solução de NaCl 0,9% s.c. (no grupo de longo prazo, esta salina foi enriquecida com 5% de glicose para melhorar a sobrevivência) para repor fluidos e evitar a desidratação. A incisão na pele foi, então, fechada com alguns pontos de sutura e a sonda do LDF removida. Os animais do grupo de curto prazo foram postos durante o tempo de isquemia em uma caixa aquecida a aproximadamente 35-37°C com auxílio de uma lâmpada de infravermelho, onde despertavam da anestesia. Antes do tempo de oclusão da ACM, o animal foi novamente anestesiado com isoflurano e a sonda do LDF foi recolocada no osso parietal. Os animais de longo prazo permaneceram anestesiados durante os 40 min na mesa operatória aquecida, sem se retirar a sonda. O filamento foi gentilmente retirado ao se completar os 40 ou 60 min de oclusão, monitorando-se o aumento do FSC. Após a retirada do filamento, as ligaduras da ACI e a da ACC foram apertadas. Foi administrada novamente a salina como descrito acima. Novamente, a pele foi fechada com a aplicação de sutura cirúrgica e os animais postos na caixa aquecida durante 2 h para recuperação da

cirurgia. Nos animais de longo prazo foi administrada gentamicina 20 µg em 100 µL s.c. (Kang et al., 2013; Kang et al., 2012). Os animais do grupo falso operado sofreram as incisões na linha média do pescoço e da cabeça, as artérias foram dissecadas, mas o MN não foi introduzido (Kilic et al., 2008). O infarto cerebral gerado neste modelo de OACM provoca déficits sensório-motores que podem ser mensurados por testes comportamentais específicos (Linden et al., 2014).

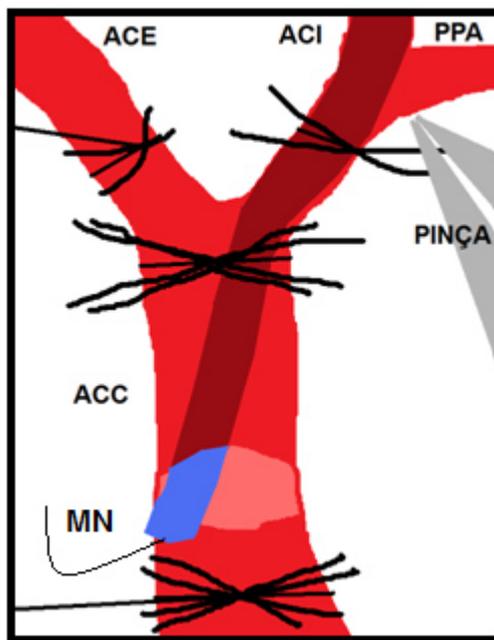


Figura 12: Esquema simplificado do procedimento de oclusão e reperusão da artéria cerebral média. As artérias são referentes ao lado esquerdo do animal. ACI: artéria carótida interna, ACE: artéria carótida externa, ACC: artéria carótida comum, PPA: artéria pterigopalatina. MN: monofilamento, a parte azul representa a parte recoberta de silicone. Ver figura 2.

Avaliação Neurológica

O déficit neurológico foi avaliado 30 min, 24 h e 2 dias após a cirurgia através de exame clínico e atribuição de um escore neurológico. Cada valor de escore e os respectivos critérios estão discriminados na Tabela 1 e foram adaptados de Costa (2005).

Tabela 1: Valores de escore neurológico e os respectivos critérios adotados.*

Escore	Crítérios
0	Déficits comportamentais não observados.
1	Circulando em raio grande, perda de massa \leq 15%, postura assimétrica.
2	Diminuição da resistência à força lateral, diminuição da força de agarramento, perda de massa \leq 15%, circulando em raio pequeno, postura normal em repouso.
3	Inclinando-se para o lado contralateral em repouso, atividade proeminente de circulação em raio pequeno, perda de massa maior que 15% em 1 dia e/ou prostração.

* (adaptada de Costa, 2005).

Avaliação do Volume de Infarto

O volume de infarto pôde ser determinado através da coloração do tecido cerebral com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC, Sigma). Dois dias após a lesão foi realizada a coloração do tecido cerebral com solução de 1% TTC em salina para avaliação do volume de infarto (Guegan et al., 1998; Swanson et al., 1990; Costa, 2005). Na presença de sistemas de desidrogenases funcionais, o TTC passa de incolor para uma coloração vermelha escura. Os tecidos necróticos não são corados por TTC, uma vez que esses tecidos não apresentam sistemas de desidrogenases funcionais. Dessa forma, pode-se distinguir facilmente o tecido necrótico (Yang et al., 1998; Liu et al., 2009). O protocolo seguiu-se da seguinte forma: os animais foram sacrificados com inalação de CO₂ por 2 minutos em câmara transparente apropriada. Os encéfalos foram retirados, colocados em uma fôrma de acrílico própria para camundongos e cortados em fatias de 2 mm de espessura, resultando em 6 fatias por cérebro, sendo que a última fatia (cerebelo) não foi utilizada no cálculo do volume de infarto. Essas fatias foram lavadas uma vez com solução de tampão fosfato 0,1M pH = 7,4 e em seguida a solução de TTC 1% foi adicionada para incubação por 30 minutos em uma estufa a 37°C. Depois foi feita a fixação das

fatias com formalina tamponada 10% por aproximadamente 1 dia, em geladeira. Em sequência, foram obtidas imagens rostrais das fatias utilizando-se um *scanner* de mesa comum (*HP scanjet 3500c*) na resolução de 1200 dpi em cores. Uma escala métrica com divisões de 1 mm foi digitalizada junto com as fatias para calibração espacial das imagens (Figura 13). Os contornos de áreas para o cálculo do volume isquêmico e hemisférico foram delineados manualmente com o programa *Image J* (Wayne Rasband, *National Institute of Health*, EUA), sem conhecimento do grupo de tratamento do animal. As áreas do infarto e dos hemisférios foram calculadas para cada fatia, multiplicadas pela espessura da fatia (2 mm) e somadas, sendo os resultados expressos em volume de infarto em relação ao volume do hemisfério contralateral – correção para edema ipsilateral e variações do volume cerebral entre animais (Nada et al., 2012).



Figura 13: Sequência de fatias em face rostral do encéfalo de camundongo submetido à oclusão intraluminal transitória da artéria cerebral média esquerda. As fatias mais superiores da figura são mais rostrais e as fatias inferiores são mais caudais. Essas fatias foram coradas com TTC 48 horas após a cirurgia. As áreas claras representam o infarto e as áreas em vermelho escuro representam o tecido que não sofreu infarto. Cada divisão da régua à esquerda é igual a 1 mm.

Teste de Força de Preensão

O teste de força de preensão foi projetado para a avaliação da força muscular e do reflexo de agarramento das patas dianteiras (Linden et al., 2014). Esse teste foi utilizado por diversos autores para avaliação da recuperação motora após OACM (Gao et al., 2008; Ishizaki et al., 2010; Kilic et al., 2008; Linden et al., 2014; Nada et al., 2012; Wang et al., 2013). Nesta dissertação, o teste foi feito imediatamente antes da cirurgia (no mesmo dia), 1 dia e 2 dias após a cirurgia. Em relação a esses tempos de realização do teste de força de preensão, os grupos experimentais foram denominados, respectivamente: D(antes); D+1; D+2. O teste foi realizado em um aparato que consiste em um transdutor de força (TF, UFI) acoplado a um computador com auxílio do MP100 (BIOPAC Systems). O animal é erguido pela cauda e colocado para agarrar com as duas patas dianteiras uma barra de metal acoplada ao TF. São feitos 5 *trials* com intervalo de poucos segundos entre eles. Os registros de força calibrados em Newton foram feitos com o programa *AcqKnowledge* (BIOPAC Systems, Inc). Assim, em cada um dos cinco *trials* foi medida uma força máxima e, então, foi obtida a média dessas forças máximas (Figura 14).

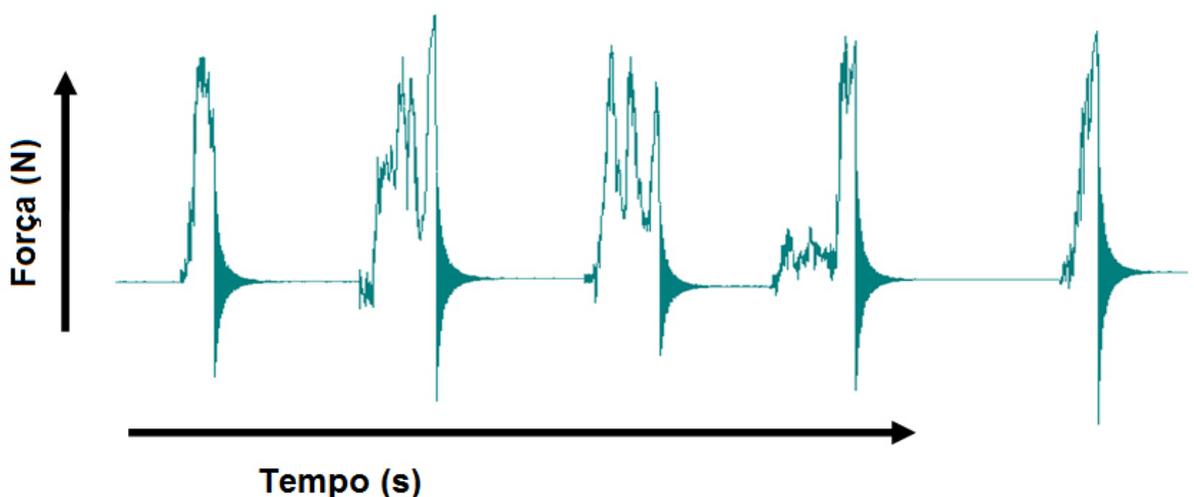


Figura 14: Registro obtido no programa *AcqKnowledge* da força de preensão dos membros dianteiros dos animais obtidos durante o teste de força.

Análise da Marcha pelo CatWalk

O camundongo é colocado em uma das extremidades da plataforma e, com treino, ele anda espontaneamente até atingir a outra extremidade. As análises foram feitas utilizando-se o equipamento e o programa CatWalk XT 10.0 (Noldus IT, Holanda, Figura 15). O sistema CatWalk foi utilizado somente no grupo de longo prazo e da seguinte forma: um teste de 1 a 3 dias antes da cirurgia e 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. Em cada dia foram realizadas três corridas consecutivas. Depois foi feita uma média dos valores dos parâmetros das três corridas (triplicata). Antes do início da primeira corrida de um dia, os animais são deixados na sala por 15 minutos para ambientação. Os ajustes do sistema do CatWalk foi da seguinte forma: 4 cm de espessura da plataforma, 48 cm de distância entre a plataforma e a câmera, 8,485 de ganho, 0,03 de intensidade. Este último parâmetro pode e foi reajustado no momento das análises. As corridas foram classificadas no programa de computador do CatWalk da seguinte forma: o limiar de intensidade foi reajustado conforme a necessidade para entre 0,9 e 0,12; as patas foram primeiramente classificadas pela função de auto classificação do programa em direitas e esquerdas, anteriores e posteriores; depois desta classificação, as corridas são revisadas para a correção de erros da classificação das patas. Selecionamos a maior parte dos parâmetros de análise de corridas; os gráficos gerados pelo CatWalk para inspeção foram salvos e os dados numéricos foram exportados para planilhas do Excel (Microsoft Corp.). Posteriormente, os dados das planilhas foram transferidos para o programa *GraphPad Prism* versão 5 para testes estatísticos.



Figura 15: Sistema de análise da marcha do CatWalk (modificado de <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/catwalk>).

Grupos Experimentais e Tratamentos

Os desenhos experimentais dos grupos de curto prazo e do de longo prazo estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 16 e 17. O AAsa e seu derivado acetilado (LDT13) foram administrados por via subcutânea na dose de 100 mg/kg (0,1 ml/20 g) após a indução da IR. Essa dose foi determinada a partir de dados do Laboratório de Farmacologia Molecular sobre os efeitos do AAsa e de seus derivados acetilados em modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. Nesses resultados o LDT11 e o LDT13 tiveram um efeito antiinflamatório (dados não publicados). O AAsa e seu derivado acetilado LDT13 foram dissolvidos em solução veículo composta na proporção em volume 1:1:8 de álcool absoluto, polissorbato *Tween* 80 e água deionizada, respectivamente. Foram feitas avaliações dos animais em curto e em longo prazo, sendo que o esquema de tratamento foi o mesmo. Os grupos experimentais de curto prazo foram: Falso Operados, Veículo, LDT11 e LDT13 (Tabela 2). Na situação de longo prazo fizemos os grupos Veículo e Falso Operados.

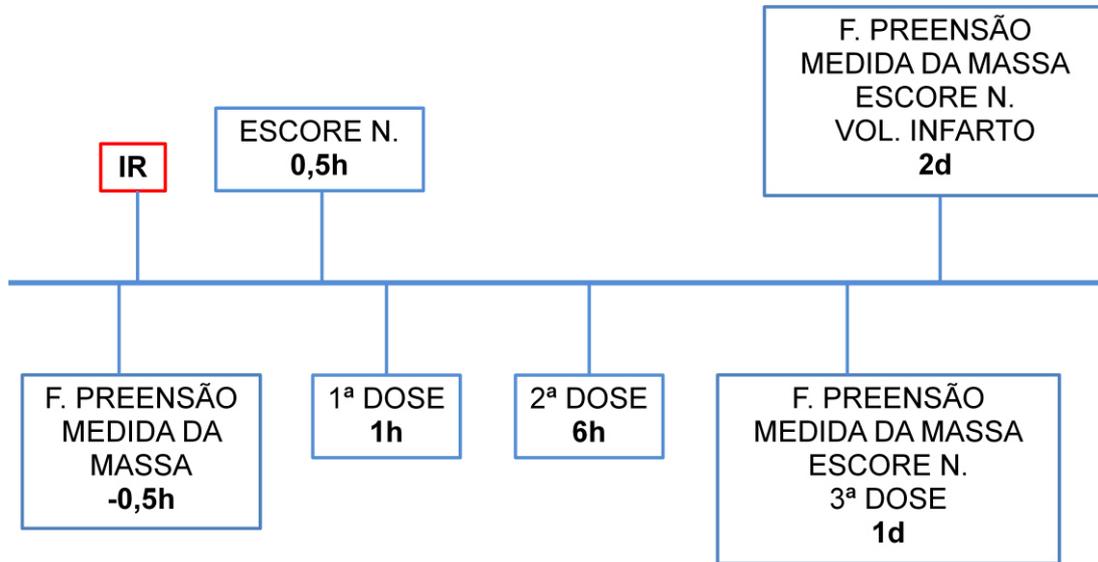


Figura 16: Desenho experimental de curto prazo. O tempo em negrito é em relação à cirurgia de isquemia e reperfusão (IR). h: hora, d: dia.

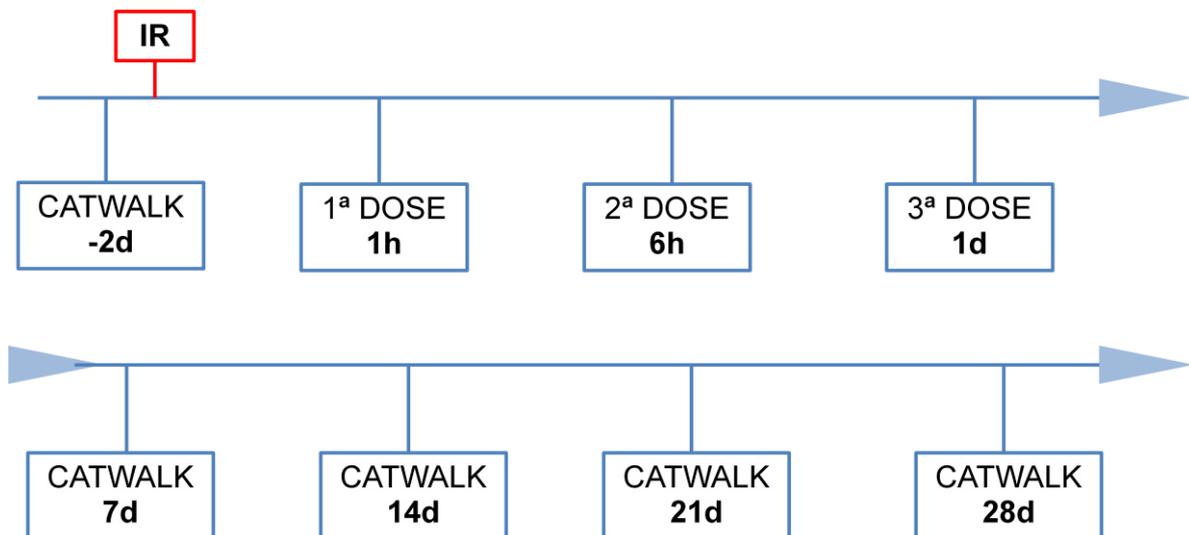


Figura 17: Desenho experimental de longo prazo. O tempo em negrito é em relação à cirurgia de isquemia e reperfusão (IR). h: hora, d: dia.

Grupos Experimentais: Curto Prazo

Grupo	Tratamento	
	Substância	Frequência
Falso Operados	---	---
Veículo	Veículo	1h, 6h e 1 dia após a reperfusão.
LDT11	LDT11	
LDT13	LDT13	

Tabela 2: Grupos experimentais de curto prazo. h: hora.

Análises Estatísticas

Os dados são relatados como média \pm erro padrão da média (EPM). Todas as análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) através do programa *GraphPad Prism* versão 5. Para a comparação de médias, foi utilizado principalmente o teste *t* de Student pareado, mas também a análise de variância (ANOVA). Na análise da mortalidade foi utilizado o teste exato de Fischer e na análise do escore neurológico utilizamos o teste Wilcoxon e o teste Mann Whitney. Os testes estão indicados nas legendas das figuras.

Resultados

O método de indução de isquemia e reperfusão cerebrais pela oclusão intraluminal, focal e transitória da artéria cerebral média foi estabelecido no Laboratório de Farmacologia Molecular (LFM) durante o trabalho desenvolvido nesta dissertação. Durante o processo de estabelecimento dessa metodologia foi investigado qual deveria ser o diâmetro adequado do filamento oclisor para animais de massa entre 25 e 34 g. Uma vez que o calibre das artérias varia conforme o peso do animal, é crítica a relação massa do animal / diâmetro do filamento para se obter uma oclusão satisfatória da ACM (FSC na oclusão \leq 30% do FSC basal). Inicialmente preparamos filamentos oclusores recobrando suturas MN com massa de silicone de moldagem dentária, determinando suas dimensões exatas por imageamento ao microscópio. Filamentos de diferentes calibres e comprimentos foram avaliados em experimentos preliminares. Finalmente, encontramos que o filamento adequado foi de 210 μ m de diâmetro (diâmetro referente à região de silicone) para animais na faixa de massa corpórea selecionada.

Avaliação a Curto Prazo

Durante o processo de estabelecimento da metodologia, fizemos os grupos de curto prazo (Falso Operados, Veículo, LDT11 e LDT13) para padronização da metodologia de indução de IR cerebrais no nosso laboratório. E, em seguida, fizemos o grupo Veículo de longo prazo.

Fluxo Sanguíneo Cerebral

Durante o procedimento cirúrgico, foram monitoradas as variações do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) em tempo real com o objetivo de se verificar se houve oclusão da ACM e qual o FSC de oclusão em relação ao FSC basal, pois selecionamos para as análises os animais com um FSC de oclusão \leq 30%. Nos gráficos gerados pelo sistema LDF é possível medir um fluxo médio basal, um fluxo após a ligadura da ACC, um fluxo após a inserção do filamento (oclusão) e um fluxo de reperfusão, que é referente ao fluxo após a retirada do filamento (Figura 18).

Verificamos que o fluxo de oclusão é menor do que o da ACC ligada, que é menor em relação ao fluxo basal. O fluxo de reperfusão é maior do que o fluxo de oclusão (Figura 18).

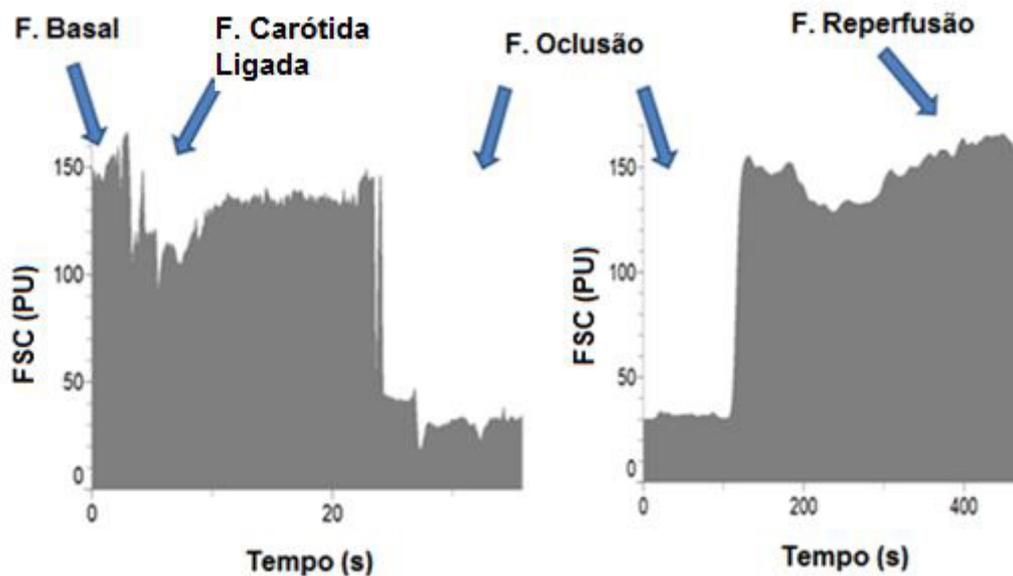


Figura 18: Perfil de variação do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) durante as etapas do período da cirurgia. PU: unidade arbitrária de perfusão. F: fluxo.

A quantificação e as análises das variações do FSC durante as cirurgias mostraram que todas as diferenças entre os fluxos, dentro de cada grupo experimental, foram significativas. Não obstante, não houve diferenças significativas entre os fluxos de oclusão entre os grupos experimentais; idem para o fluxo reperfusão. Para as análises, consideramos o fluxo basal igual a 100% para avaliarmos as alterações relativas do FSC. No grupo Veículo, o fluxo carótida ligada foi de 65,46%, o fluxo oclusão foi de 19,66%. No grupo LDT11, o fluxo carótida ligada foi de 69,63% e o fluxo oclusão foi de 19,01%. No grupo LDT13, o fluxo carótida ligada foi de 72,89%, o fluxo oclusão foi de 13,76%. (Figura 19).

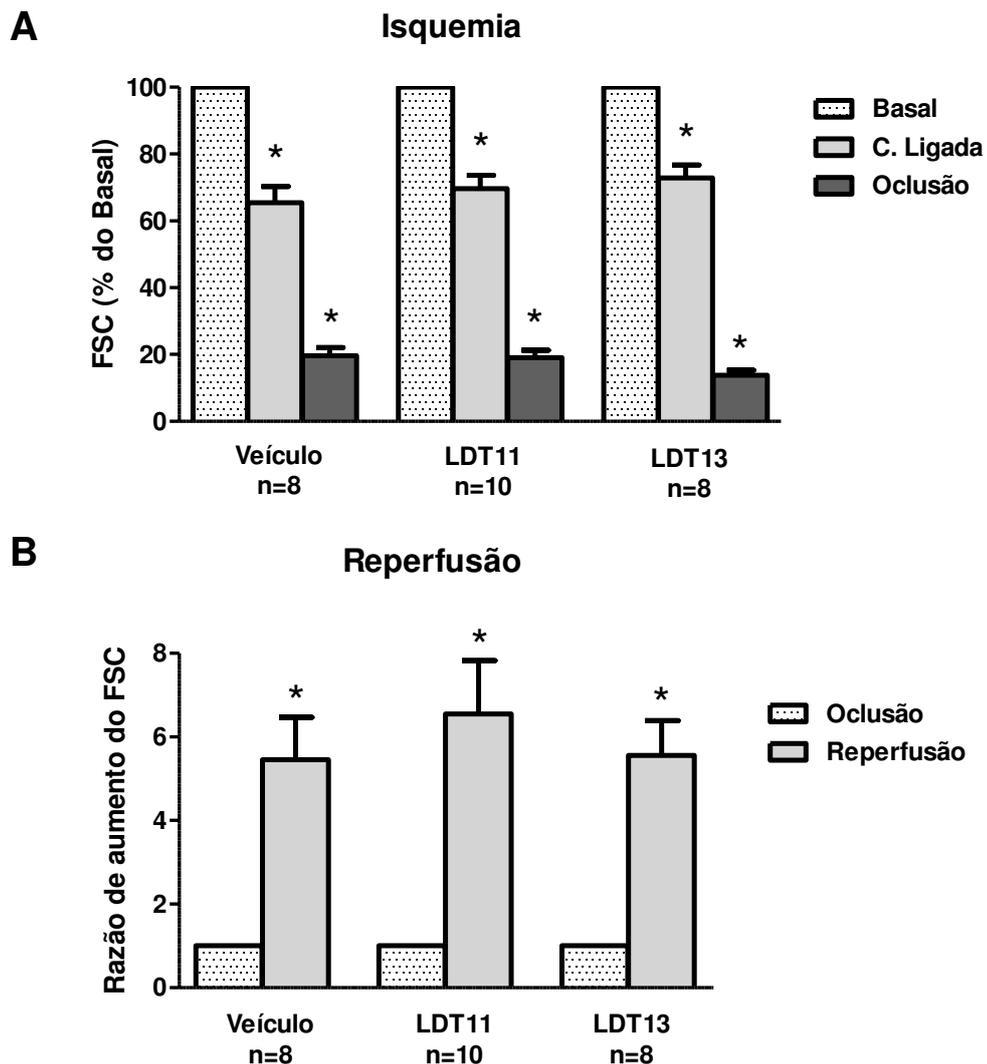


Figura 19: Variação do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) nos processos de isquemia (A) e de reperusão (B), referentes ao grupo de curto prazo. As diferenças médias entre todas as condições são significativas (teste *t* pareado, *: $p < 0,05$ comparado com Basal na isquemia ou com Oclusão, na reperusão). C.: carótida comum.

Massa Corpórea

Para acompanhar o estado geral de saúde dos animais decorrente dos insultos gerados pelo procedimento cirúrgico e pela IR cerebrais, avaliamos a massa corpórea nos seguintes tempos: imediatamente antes da cirurgia, 1 dia e 2 dias após a reperusão. As análises sempre foram feitas comparando, dentro de cada grupo experimental, as condições pós-cirúrgicas com a condição pré-cirúrgica, considerada 100% (Figura 20). No grupo Falso Operado, as porcentagens das médias das

massas foram 96,9% e 97,4%, respectivamente, em 1 e 2 dias após a cirurgia, refletindo redução pequena, mas significativa, de 3,1% e de 2,6%. No grupo Veículo, as médias das massas foram 85,0% e 77,0% respectivamente em 1 e 2 dias após a cirurgia, refletindo uma redução significativa de 15,0% e de 23,0%, respectivamente. No grupo LDT11, as médias das massas foram 85,8% e 79,0% respectivamente em 1 e 2 dias após a cirurgia, refletindo uma redução significativa de 14,2% e de 21,0%, respectivamente. No grupo LDT13, as médias das massas foram 86,7% e 80,1% respectivamente em 1 dia e 2 dias após a reperfusão, refletindo uma redução significativa de 13,3% e de 19,9%, respectivamente. Na comparação entre os grupos de animais isquêmicos (Veículo, LDT11 e LDT13) com o grupo falso operado, no mesmo tempo pós-cirúrgico (1 dia e 2 dias), todas as diferenças foram significativas. Portanto, os animais que sofreram a isquemia cerebral perderam massa corpórea em relação aos animais falso operados. Na comparação entre os grupos que sofreram IR, não encontramos diferenças significativas em relação à perda de massa.

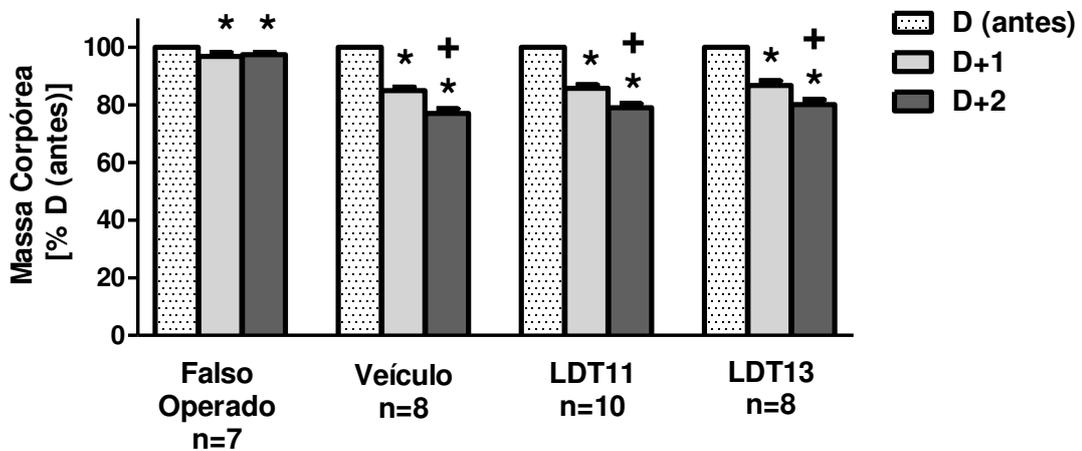


Figura 20: Massa corpórea dos animais 30 min antes, 1 dia e 2 dias após a IR. Teste t pareado. * $p < 0,05$ comparado com D (antes) e + $p < 0,05$ comparado com D+1 dentro de cada grupo experimental.

Mortalidade

Avaliamos a mortalidade pós-cirúrgica como mais um parâmetro de saúde animal. No grupo Falso Operados não houve mortalidade (Figura 21). No grupo Veículo, houve 11 animais mortos e 8 animais vivos (57,9% morreram). No grupo LDT11 houve 1 animal morto e 10 animais vivos (9% de mortalidade). No grupo LDT13 houve 1 animal morto e 8 animais vivos (11% de mortalidade). Nos grupos LDT11 e LDT13 houve uma redução significativa da mortalidade em relação ao grupo Veículo. Desses animais que morreram, a maioria morreu poucas horas após a cirurgia.

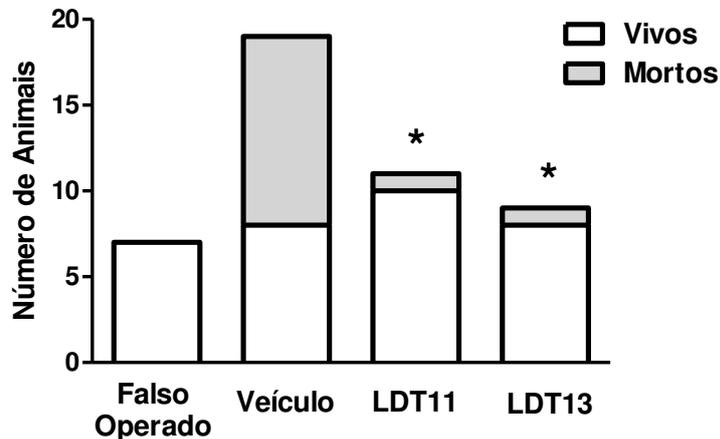


Figura 21: Mortalidade após a cirurgia. Teste exato de Fisher para o número de mortos; * $p < 0,05$ comparado com Veículo.

Teste de Força de Preensão

O teste de força de preensão foi utilizado para avaliar a força dos membros dianteiros dos animais imediatamente antes da cirurgia, 1 dia e 2 dias após a reperusão. As análises sempre foram feitas comparando, dentro de cada grupo experimental, as condições pós-cirúrgicas com a condição pré-cirúrgica, considerada igual a 100% (Figura 22). No grupo Falso Operados, as médias das forças foram 106,3% e 105,8% respectivamente em 1 dia e 2 dias após a cirurgia, sendo que esse aumento da força não foi significativo. No grupo Veículo, as médias das forças

foram 80,4% e 82,5% respectivamente em 1 dia e 2 dias após a cirurgia, refletindo reduções significativas de 19,6% e de 17,5%, respectivamente. No grupo LDT11, as médias das forças foram 104,8% e 105,2% respectivamente em 1 dia e 2 dias após a reperfusão, sendo que esse aumento da força não foi significativo. Portanto, nesse grupo não houve redução da força de preensão, diferente do observado no grupo Veículo. No grupo LDT13, as médias das forças foram 90,9% e 75,5% respectivamente em 1 dia e 2 dias após a reperfusão, refletindo reduções significativas de 9,1% e de 24,5%, respectivamente (Figura 22).

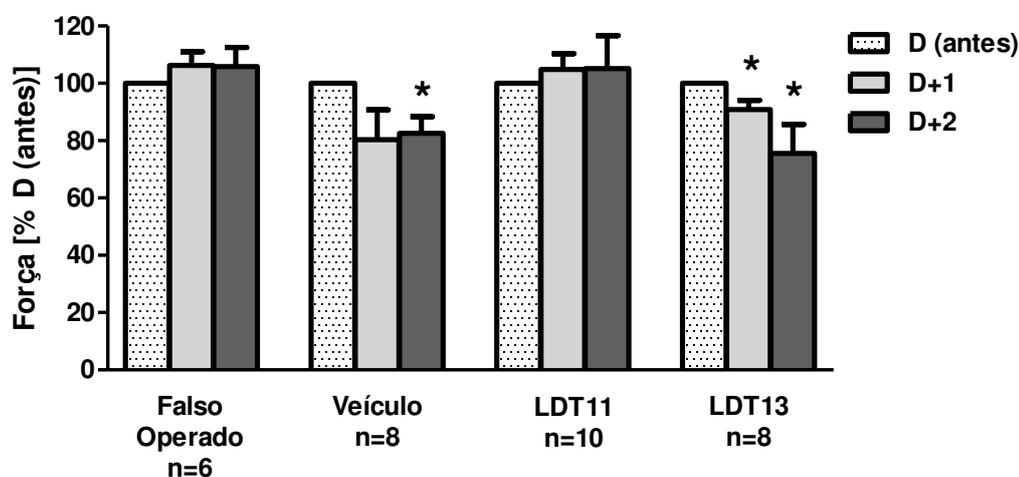


Figura 22: Força de preensão dos membros dianteiros 30 minutos antes, 1 dia e 2 dias após a IR. Teste t pareado; *p < 0,05 comparado com o grupo D (antes) dentro de cada grupo experimental.

Escore Neurológico

O escore neurológico foi utilizado como um parâmetro, embora grosseiro, para avaliar os déficits neurológicos dos animais nos seguintes períodos de tempo após a reperfusão: até 30min, 1 dia e 2 dias. No grupo Falso Operados, o escore foi sempre zero. As análises sempre foram feitas comparando, dentro de cada grupo experimental, as condições 1 dia e 2 dias com a condição 30 min (Figura 23). É importante salientar que nos três grupos (Veículo, LDT11 e LDT13) o escore de todos os animais no tempo de 30 min após a cirurgia foi máximo (igual a 3). Portanto, logo após a indução da IR os animais se apresentaram prostrados, com dificuldade de manter a postura vertical e fazendo movimentos circulares. Com o

passar dos dias, as médias dos escores diminuíram nos três grupos, demonstrando uma melhora espontânea dos animais. No grupo Veículo, as médias dos escores foram 2,1 e 1,6, respectivamente em 1 dia e 2 dias após a cirurgia, refletindo reduções não significativas de 29% e de 48%, respectivamente. No grupo LDT11 as médias dos escores foram 2,3 e 2,0 respectivamente em 1 dia e 2 dias após a cirurgia, refletindo uma redução não significativa de 23% em 1 dia após a reperfusão e uma redução significativa de 33% em 2 dias após a reperfusão. No grupo LDT13, as médias foram 2,6 e 2,1, respectivamente em 1 dia e 2 dias após a cirurgia, refletindo reduções não significativas de 15% em 1 dia e de 30% em 2 dias (Figura 23).

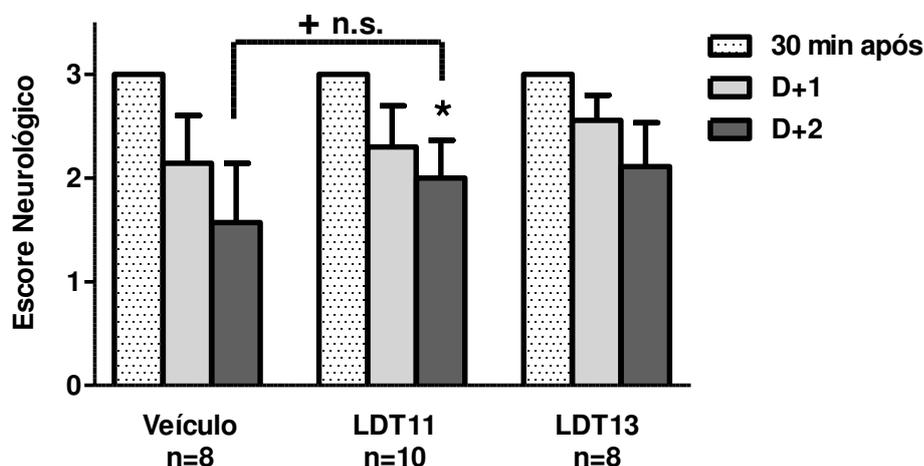


Figura 23: Escore neurológico 30 min, 1 dia e 2 dias após a IR. * Teste de Wilcoxon $p < 0,05$ comparado com 30 min após dentro do grupo experimental. +Teste Mann-Whitney, n.s.

Volume e Localização do Infarto

O volume médio de infarto no grupo Veículo foi de $66,3 \text{ mm}^3$ (33,8% do hemisfério contralateral), no grupo LDT11 foi de $70,0 \text{ mm}^3$ (35,3% do hemisfério contralateral) e no grupo LDT13 foi de $61,5 \text{ mm}^3$ (32,1% do hemisfério contralateral). Não houve diferenças significativas entre esses grupos com relação ao volume de infarto (Figura 24).

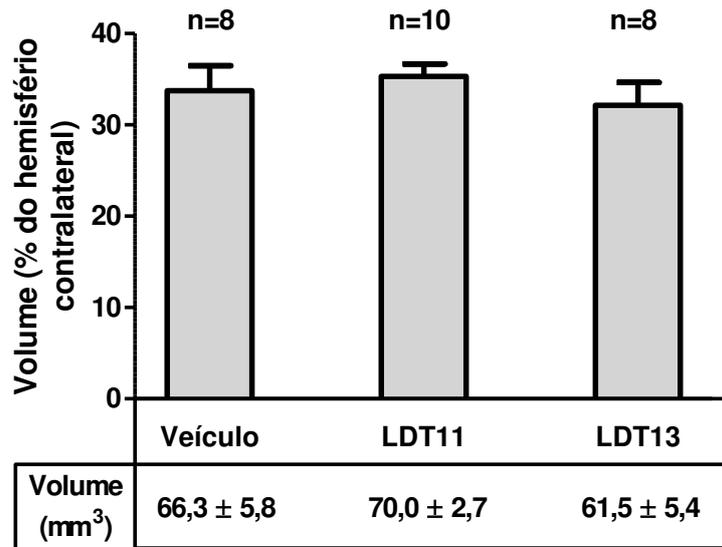


Figura 24: Volume do infarto 2 dias após a IR. Teste ANOVA n.s.

Realizamos um mapeamento das regiões cerebrais acometidas pelo infarto; para isso, fizemos uma comparação entre o atlas de Paxinos (2001) e imagens das fatias coradas com o TTC de animais do grupo Veículo em 2 dias após a IR. De acordo com essas análises, as principais estruturas afetadas nos animais do grupo Veículo foram: córtex somatossensorial, córtex insular, córtex piriforme, córtex de associação frontal, córtex orbital, córtex pré-límbico, córtex motor primário, cápsula interna, corpo caloso, caudato-putamem e globo pálido (estriado; Figura 25).

Localização do Infarto

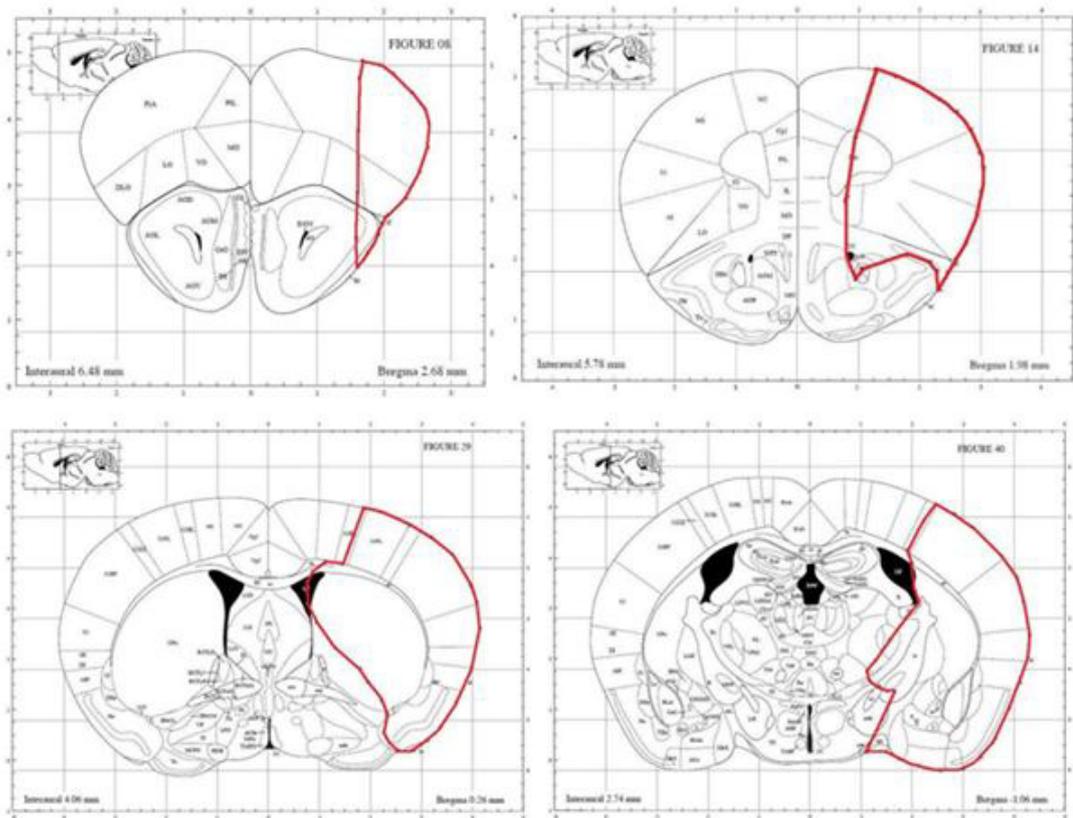


Figura 25: Localização das estruturas cerebrais afetadas pela isquemia cerebral. Os contornos delimitam as regiões afetadas. Exemplo de um animal do grupo Veículo 2 dias após a cirurgia (adaptada de Paxinos e Franklin, 2001).

Outra análise que fizemos foi para verificar se existiu uma correlação entre o FSC de oclusão e o volume de infarto nos três grupos Veículo, LDT11 e LDT13. Não encontramos correlações entre essas duas variáveis nesses três grupos (Figura 26). Cabe notar que dois animais do grupo LDT11 que tiveram redução inadequada do FSC no procedimento de IR de fato não tiveram infarto cerebral, confirmando a utilidade do critério de exclusão. Como foi descrito em Materiais e Métodos, somente utilizamos para as análises funcionais a curto e a longo prazo os animais que obtiveram FSC de oclusão menor ou igual a 30% do fluxo basal (Figura 26).

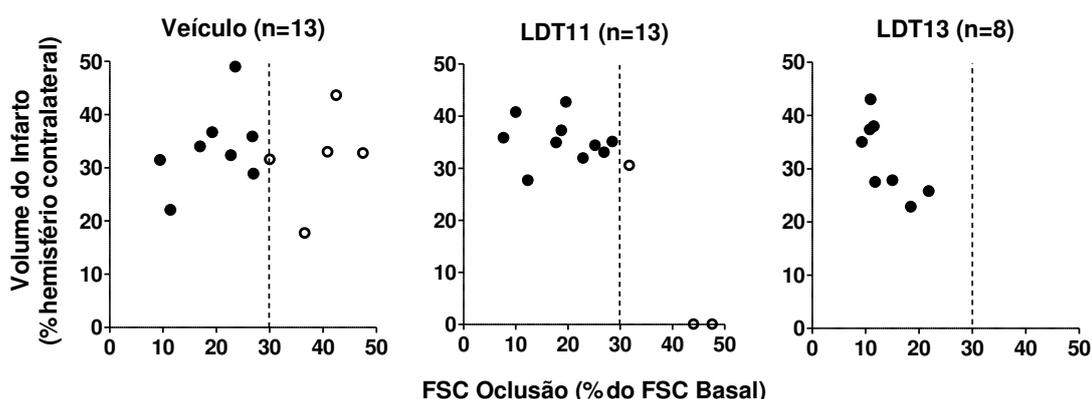


Figura 26: Relação entre o FSC de oclusão e o volume de infarto nos três grupos de curto prazo: Veículo, LDT11 e LDT13. Os gráficos mostram também os animais que foram excluídos da análise funcional por terem FSC de oclusão maior que 30% do basal (símbolos vazios).

Avaliação a Longo Prazo

Na avaliação a longo prazo acompanhamos os animais durante quatro semanas, sendo que a cada sete dias avaliamos os animais com o CatWalk.

Fluxo Sanguíneo Cerebral

Assim como nos grupos de curto prazo, no grupo de longo prazo, durante o procedimento cirúrgico, foram monitoradas as variações do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) em tempo real com o objetivo de se verificar se houve oclusão da ACM e qual o FSC de oclusão em relação ao FSC basal, pois selecionamos para as análises os animais com um FSC de oclusão $\leq 30\%$. A quantificação e as análises das variações do FSC durante as cirurgias foram feitas assim como para os grupos de curto prazo. Essas análises mostraram que o fluxo de oclusão foi significativamente menor do que o fluxo registrado somente com a carótida ligada, que foi significativamente menor do que o fluxo basal. Nestes experimentos foi possível comparar os FSCs ao longo de todo o procedimento, pois o animal permaneceu anestesiado e a sonda não foi retirada. Na reperfusão, o fluxo voltou a valores semelhantes ao registrado com a carótida ligada. Para as análises, consideramos o fluxo basal igual a 100% para avaliarmos as alterações relativas do FSC. No grupo Veículo, o fluxo c. ligada

foi de 56,1%, o fluxo de oclusão foi de 10,9% e o fluxo de reperfusão foi de 52,8% (Figura 27).

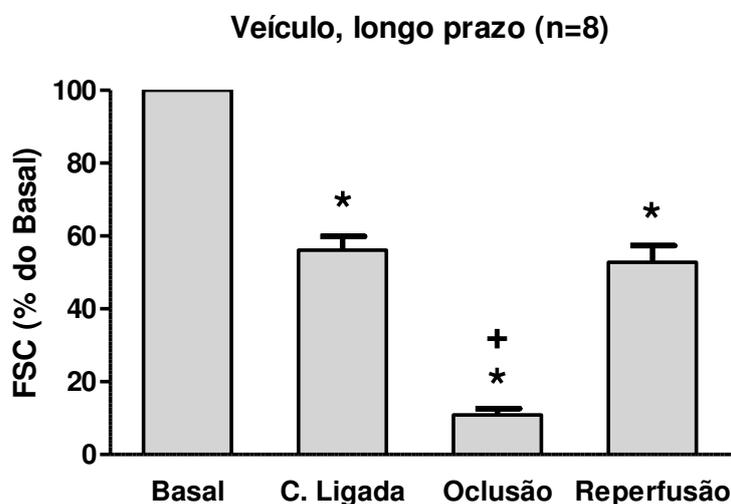


Figura 27: Variação do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) nos processos de isquemia e de reperfusão no grupo Veículo a longo prazo. C. Ligada: fluxo com a carótida comum ligada. Teste *t* pareado: * $p < 0,05$ comparado com Basal e + $p < 0,05$ comparado com C. Ligada e com Reperusão.

Mortalidade

Visando avaliar as consequências funcionais dos insultos gerados pelo procedimento cirúrgico e pela IR cerebrais em um período mais longo pós-cirúrgico, avaliamos a mortalidade após a cirurgia nos animais no grupo de longo prazo durante os 28 dias pós-cirúrgicos. Nos experimentos pilotos obtivemos 100% de mortalidade durante a primeira semana após a cirurgia, mostrando que os animais que sobreviveram por 48 h no grupo de curto prazo provavelmente morreriam nos dias seguintes. Assim, reduzimos o período de isquemia de 60 minutos para 40 minutos e buscamos formas de melhorar os cuidados pós-operatórios para reduzir a mortalidade. Os cuidados pós-operatórios implementados foram: tratamento com o antibiótico gentamicina (20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ s.c.) logo após a cirurgia e adição de 5% de glicose à salina 0,9% que já era utilizada (1000 μL s.c.). Com essa redução do período de isquemia e adição desses cuidados, obtivemos redução da mortalidade para 27,3% no grupo Veículo (3 animais mortos e 8 animais vivos), permitindo-nos

fazermos a avaliação a longo prazo. Importante notar que as mortes também ocorreram durante a primeira semana após a cirurgia.

Análise da Marcha pelo CatWalk

Realizamos a análise automática de marcha a partir do imageamento das pegadas em camundongos com o objetivo de avaliar a função sensório-motora após lesão decorrente da isquemia e reperfusão cerebrais. Essa avaliação foi feita durante 28 dias após o insulto isquêmico através do sistema *CatWalk*. Este sistema automaticamente analisa dezenas de parâmetros relacionados à marcha dos animais (Apêndice A). Nas nossas análises encontramos poucas alterações nos animais isquemiados tratados com veículo, quando comparados com os falso-operados (FO). Uma diferença evidente foi a aparente ausência do padrão de aumento progressivo da área de impressão das patas traseiras ao longo do tempo, observado nos animais normais FO (Figura 28). Encontramos diferenças significativas comparando a média das taxas de crescimento da área de impressão das patas posteriores do grupo FO com a do grupo Veículo. Essas taxas foram calculadas para cada pata posterior de cada animal a partir de regressão linear da área de impressão da pata em relação ao tempo (Figura 28).

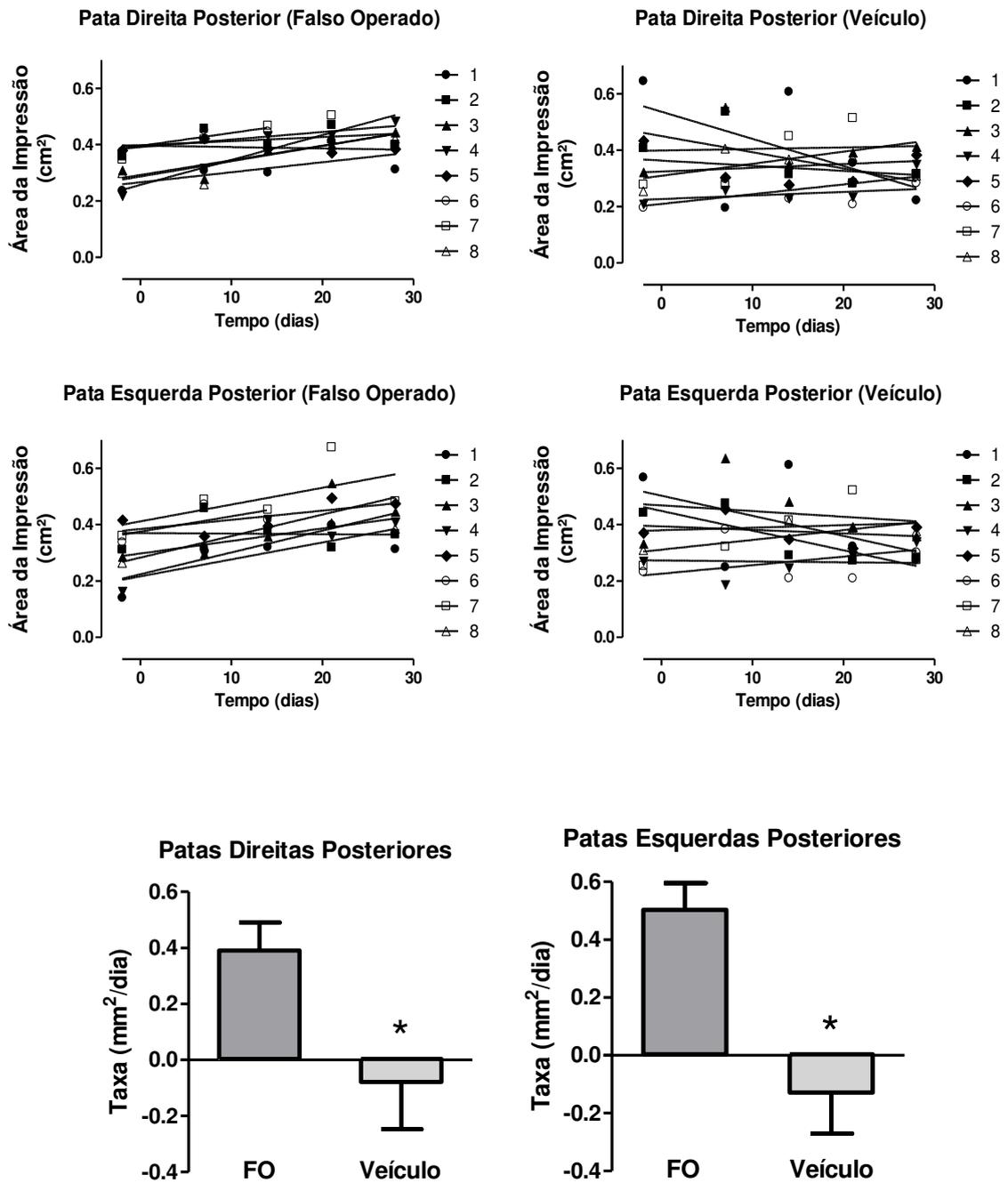


Figura 28: Áreas das patas traseiras dos animais medidas no sistema *CatWalk* nos grupos Falso Operado (FO) e Veículo a longo prazo. Nos gráficos de pontos estão mostradas as regressões lineares para cada animal (animais numerados de 1 a 8). Nos gráficos de barras estão mostradas as médias dos coeficientes angulares das regressões lineares (taxas). Teste *t* não pareado. **p* < 0,05 comparado com FO.

Discussão

O modelo de indução de isquemia cerebral por oclusão intraluminal da artéria cerebral média em camundongos é atualmente o método mais comumente utilizado entre os modelos de AVE em roedores. Este modelo é considerado pouco invasivo e não requer craniectomia, sendo esta última característica uma vantagem no sentido de evitar danos às estruturas cranianas e dor no animal. Algumas outras vantagens deste modelo são: 1) mimetiza o AVE humano, que frequentemente ocorre pela oclusão da ACM; 2) apresenta uma penumbra isquêmica, que é similar à que ocorre no AVE humano; 3) gera grandes volumes de infarto; 4) alta reprodutibilidade; 5) pode-se controlar precisamente a duração da isquemia e a da reperfusão. No entanto, assim como todo modelo, este também possui desvantagens, como: 1) é crítico determinar o tipo e diâmetro adequados do filamento para gerar a oclusão; 2) pode gerar hipertermia ou hipotermia no animal isquêmico; 3) pode gerar hemorragia subaracnoidea (Fluri et al., 2015); 4) é um procedimento que exige muito treinamento porque consiste em uma manipulação bastante fina e precisa, e 5) pode gerar alta mortalidade.

Nos nossos experimentos, as médias das massas dos animais reduziram significativamente após a cirurgia em relação às massas pré-cirúrgicas em todos os quatro grupos de curto prazo: Falso Operados, Veículo, LDT11 e LDT13. É interessante notar que o grupo Falso Operados também apresentou uma redução significativa da massa, no entanto, essa redução foi significativamente menor do que as que ocorreram nos grupos de animais que sofreram a IR: Veículo, LDT11 e LDT13. Portanto, o estresse gerado pela manipulação e pelos procedimentos cirúrgicos sem a presença da IR (grupo Falso Operados) foi capaz de provocar perda de massa. Esse estresse somado ao dano neurológico gerado pela IR aumentaram ainda mais a perda de massa nos animais submetidos à OACM. Ferrara e colaboradores (2009), usando o mesmo modelo de OACM em camundongos, encontraram redução da massa corpórea e do consumo de alimentos principalmente pelos animais isquêmicos, corroborando nossos dados. Portanto, é provável que nossos animais isquêmicos tiveram maior perda de massa devido a

uma maior redução do consumo de alimentos decorrente da lesão. Trueman e colaboradores (2011) compararam alguns modelos de OACM pelo filamento em ratos e encontraram resultados semelhantes; os animais que sofreram a isquemia cerebral tiveram uma perda de massa mais severa após a cirurgia do que os animais falso-operados. Além disso, encontraram que a redução de massa ocorreu principalmente nos primeiros cinco dias pós-cirúrgicos. Esses achados estão de acordo com nossos dados em camundongos, que mostraram redução progressiva, de 15,0% e 23,0% da massa, respectivamente, no primeiro e no segundo dias após a cirurgia. Dados de nosso laboratório mostram que camundongos suíços saudáveis perdem de 4 a 5 g (13-17%) de massa quando privados de ração por 24 h (sem privação de água), mas recuperam-se totalmente 24 h após a reintrodução de ração. Portanto, a diminuição da ingestão, devida à prostração, deve ser suficiente para explicar a rápida espoliação nutricional nos animais submetidos à OACM.

Visando avaliar a saúde animal e a gravidade dos insultos gerados pelos procedimentos cirúrgicos e pela IR cerebrais, avaliamos a mortalidade após a cirurgia. Apesar de serem pouco relatados na literatura, os dados de mortalidade são importantes como um desfecho clínico dos tratamentos experimentais e para que novos grupos que venham a implementar a metodologia possam usar como parâmetro de comparação. O principal determinante da mortalidade nos modelos de isquemia transitória parece ser a duração da oclusão (Schulte-Herbruggen et al., 2006). Nos grupos de curto prazo, isquemiados por 60 min, a mortalidade em até 2 dias pós-cirúrgicos e foi de 57,9% no grupo Veículo. Esse valor é mais alto do que os encontrados por outros autores. Por exemplo, Ferrara e colaboradores (2009), usando o mesmo modelo de OACM por 60 min em camundongos 129S2, obtiveram 15% de mortalidade nos dois primeiros dias pós-cirúrgicos. Entretanto, Smith e colaboradores (2015) fizeram OACM por 30 min em camundongos C57BL/6 e encontraram 44% de mortalidade em 24 h. Esses exemplos da literatura mostram como essas taxas de mortalidade podem variar. Além do período de oclusão, as causas dessas variações são, por exemplo, diferenças de linhagem dos camundongos, *background* genético dos animais e cuidados per e pós-operatórios.

No grupo Veículo de longo prazo, com OACM de 40 min, a mortalidade foi avaliada em até 28 dias pós-cirúrgicos e foi de 27,3%, sendo que as mortes ocorreram na primeira semana após a cirurgia. Meisel e colaboradores (2004) utilizaram o modelo em camundongos Sv129/J de OACM pelo filamento com 60

minutos de isquemia e avaliaram os animais durante 14 dias após a cirurgia. Eles encontraram uma mortalidade de 57% até o 6º dia que, assim como em nossos experimentos, se restringiu à primeira semana pós-cirúrgica. Prass e colaboradores (2003), utilizando também o mesmo modelo de OACM na mesma linhagem de camundongos, encontraram 60% de mortalidade durante os primeiros 7 dias (mortalidade também restrita à primeira semana). Uma das causas da mortalidade pós-AVE é a infecção sistêmica e o mesmo se observa nos modelos experimentais. Schulte-Herbruggen e colaboradores (2006) verificaram se a susceptibilidade a infecções pós-AVE isquêmico em camundongos depende da linhagem. Três dias após o AVE isquêmico, a linhagem Sv129 teve infecções pulmonares bacterianas e uma maior ocorrência de bacteremia, enquanto que C57BL/6 e Balb/C adquiriram somente infecções pulmonares bacterianas. Portanto, existe um aumento da susceptibilidade a infecções após o AVE, que varia de acordo com a linhagem murina. Esse aumento da susceptibilidade a infecções pode ser devido à imunossupressão (Meisel et al., 2004) e pode ser uma das causas para a mortalidade no nosso modelo de AVE em camundongos. Nos animais de curto prazo não fizemos tratamento com antibióticos, o que pode ser uma das causas da alta mortalidade. Nos experimentos-pilotos no grupo Veículo de longo prazo obtivemos 100% de mortalidade na primeira semana antes de incluir nos experimentos o tratamento com antibióticos. Tendo em vista a importância das infecções para o desfecho, provavelmente a profilaxia com antibióticos pós-operatórios no grupo de longo prazo contribuiu para reduzir a mortalidade para 27,3%, junto com a menor duração da isquemia.

Em relação aos grupos de curto prazo, encontramos uma redução da mortalidade nos animais tratados com os LDT's em relação ao grupo Veículo. Essa redução pode ser devida a efeitos independentes de neuroproteção, como não observamos redução do volume de infarto nos animais tratados. Os ácidos anacárdicos podem ser anti-inflamatórios e analgésicos, o que melhoraria o pós-operatório dos animais, e também têm efeito antibiótico, como descrito por Hamad e Mubofu (2015).

O teste de força de preensão foi utilizado por diversos autores em diversos modelos de isquemia cerebral para avaliar a recuperação motora após a IR cerebrais (Ishizaki et al., 2010; Nada et al., 2012; Wang et al., 2013). Encontramos uma redução significativa da força de preensão no grupo Veículo no segundo dia

após a IR em relação à força pré-cirúrgica. Esse resultado está de acordo com os dados de Ferrara e colaboradores (2009), que utilizaram o modelo de IR em camundongos com 60 minutos de oclusão. Eles observaram essa redução da força no grupo isquêmico controle nos dias pós-cirúrgicos (2, 4 e 7). No entanto, nesse mesmo trabalho, eles encontraram resultados semelhantes no grupo Falso Operados, o que difere dos nossos achados, que não mostraram variações significativas da força nos animais falso-operados em 1 e 2 dias. Dessa forma, Ferrara e colaboradores (2009) concluíram que esse teste não foi adequado para a avaliação motora decorrente da IR cerebrais. Nos nossos resultados, os animais isquemiados perderam força dos membros dianteiros e portanto o teste detectou adequadamente essa sequela motora. O tratamento com o LDT11 preveniu essa sequela, enquanto que o tratamento com o LDT13 não teve efeito. Gao e colaboradores (2008) utilizaram esse teste de força para avaliar a longo prazo o efeito de gama-hidroxibutirato sobre a recuperação motora de camundongos submetidos à OACM de 30 minutos. Eles fizeram o teste antes da cirurgia, 1, 3 e 5 semanas após a IR. Eles encontraram uma redução da força dos animais isquêmicos controles em relação ao grupo Falso Operados até o tempo de 5 semanas. Por outro lado, Linden e colaboradores (2014) utilizaram esse teste 22 dias após 30 minutos de OACM em camundongos para comparar os animais que sofreram a isquemia com os falso-operados e não encontraram diferenças significativas. Portanto, há divergências na literatura quanto a utilidade deste teste para avaliação de sequelas de longo prazo.

O escore neurológico (EN) foi utilizado por diversos autores em diversos modelos de isquemia cerebral em roedores para avaliar o déficit decorrente do insulto isquêmico. Os valores de escore são determinados segundo critérios específicos, sendo que esses critérios variam conforme os trabalhos. Nossos resultados mostraram reduções não estatisticamente significativas do EN nos três grupos (Veículo, LTD11 e LDT13) nas comparações entre 1 e 2 dias após a cirurgia com 30 minutos após a reperfusão dentro do mesmo grupo experimental. No entanto, no grupo LDT11 em 2 dias após a IR encontramos uma redução significativa do EN. Este resultado poderia mostrar um efeito potencialmente benéfico do LDT11, mesmo tendo em vista que o EN é uma escala grosseira. Liu e colaboradores (2009) utilizaram o modelo de 90 minutos de OACM em camundongos e avaliaram o EN nos seguintes tempos após a reperfusão: 1,5, 6, 12 e 24 horas, 3 dias e 7 dias. Eles

encontraram uma redução significativa do EN nos tempos de 24 h, 3 d e 7 d em relação aos primeiros tempos de avaliação, demonstrando uma clara melhora espontânea dos animais. Nossos resultados também mostraram uma redução progressiva do EN nos animais controles, mas a diferença em relação ao pós-IR imediato não atingiu significância estatística. Assim, o efeito do LDT11 no EN deve ser analisado com cautela, considerando a melhora espontânea. Smith e colaboradores (2015) utilizaram o mesmo modelo em camundongos em 30 minutos de isquemia e 24 h de reperfusão. Eles encontraram um EN alto e significativamente maior do que o do grupo Falso Operados em 24 h, mas não uma semana após a cirurgia. Os nossos resultados e os da literatura mostram que camundongos ou ratos que sofreram isquemia cerebral severa têm um déficit neurológico inicial alto, mas que tende a diminuir em poucos dias, mostrando uma recuperação espontânea. As funções comportamentais após o AVE são recuperadas mais rapidamente nestes roedores do que em primatas não humanos, devido ao maior potencial de plasticidade cerebral daqueles (Costa, 2005).

O volume de infarto no grupo Veículo foi igual a $66,3 \text{ mm}^3$, ou 33,7% do hemisfério contralateral. Liu e colaboradores (2014) utilizaram um modelo semelhante, com 60 minutos de oclusão, e encontraram um volume de infarto de 40,6% do hemisfério contralateral nos animais controles, após 72 h de reperfusão. Esse volume de infarto é um pouco maior do que o encontrado nos nossos experimentos, apesar de termos utilizado o mesmo tempo de oclusão. Essa diferença mostra que existe variabilidade que pode depender de outras variáveis, como já foram mencionadas, diferenças de período de isquemia e reperfusão, linhagem dos camundongos, *background* genético dos animais e cuidados pós-operatórios. Ruan e colaboradores (2013) utilizaram 120 minutos de oclusão e 24 h de reperfusão, observando um volume de infarto de 75,1% do hemisfério contralateral. Portanto, comparando esses resultados, um maior tempo de oclusão tende a gerar um infarto maior, mas é possível que o tempo após a reperfusão também influencie as medidas, devido ao aumento do núcleo da lesão. O acréscimo parece ser principalmente da extensão de córtex afetado, pois está descrito na literatura que o estriado é primeiramente afetado e depois o córtex ao entorno dele (Fluri et al., 2015).

O infarto decorrente da IR abrangeu o estriado esquerdo e regiões corticais adjacentes. Essa localização está de acordo com Ferrara e colaboradores (2009) e

com Bouet e colaboradores (2007), os quais também utilizaram uma oclusão de 60 minutos em camundongos. A oclusão de 30 minutos provoca danos menores e restritos ao estriado. Além disso, a oclusão permanente da ACM pode estender a injúria isquêmica para o córtex frontal (Ferrara et al., 2009). Portanto, as regiões que são atingidas pela isquemia neste modelo dependem da duração da oclusão. O tempo de reperfusão é outra variável que influencia a localização e o volume do infarto cerebral. Por exemplo, Liu e colaboradores (2009) utilizaram o modelo de 90 minutos de OACM em camundongos e avaliaram o volume de infarto até 7 dias após a reperfusão. Eles encontraram um aumento progressivo do volume total de infarto em 1,5 h, 6 h, 12 h e 24 h, mas a partir de 24 h não houve alterações significativas. O mesmo foi observado no córtex, enquanto que no estriado a partir de 12 h já não houve alterações significativas do volume de infarto.

Os tratamentos com o LDT11 e LDT13 não foram capazes de alterar significativamente o volume do infarto, pelo menos em 48 h pós-OACM. Esse dado mostra que essas substâncias não foram eficazes em reduzir o núcleo da lesão neste tempo, mas talvez seja necessário um tempo maior para avaliar se podem prevenir a propagação do núcleo isquêmico sobre a penumbra isquêmica. No caso do LDT11, que reduziu significativamente a mortalidade em 48 h e evitou completamente a perda de força de preensão, deve-se considerar a hipótese de que teve um efeito neuroprotetor parcial, não revelado pela coloração com TTC, mas que preservou a função neural.

A iniciativa *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (1999) produz recomendações de consensos sobre o desenvolvimento de tratamentos para o AVE; um desses consensos é que é importante avaliar as sequelas sensório-motoras decorrentes do AVE e não apenas o volume de infarto. Por isso, avaliamos o LDT11 e LDT13 nesses dois aspectos. Tendo em vista que o LDT11 preveniu a redução da força dos animais isquêmicos, redução do déficit neurológico avaliado pela redução do escore neurológico e redução da mortalidade em relação ao grupo Veículo, essa substância poderia ser utilizada para a avaliação em outros modelos de AVE, inclusive para a avaliação a médio e a longo prazo.

Na avaliação de detalhes finos da marcha dos animais em 28 dias pós-cirúrgicos encontramos o parâmetro de área da impressão da pegada das patas traseiras alterando-se a uma taxa média positiva nos animais falsos operados e a uma taxa média negativa nos animais isquemiados. É possível que esse aumento nos animais

falsos operados seja consequência de um aumento maior da massa corpórea em relação aos animais isquemiados (Parkkinen et al., 2013). Encarnacion e colaboradores (2011) utilizaram um modelo de isquemia de 65 minutos de oclusão pelo filamento em ratos. Eles encontraram diferenças nesse parâmetro comparando o grupo de animais que sofreram a isquemia com o grupo de animais falsos operados. Balkaya e colaboradores (2013) utilizaram um modelo de isquemia moderada, de 30 minutos de oclusão pelo filamento em camundongos, e avaliaram a marcha dos animais a cada quatro dias durante 28 dias pós-cirúrgicos. Eles não encontraram diferenças significativas em relação à área de impressão das patas, mas observaram diferenças em vários outros parâmetros, que não foram evidentes nos nossos experimentos. Portanto, os resultados no *CatWalk* variam muito na literatura, assim como os detalhes dos modelos de AVE em que vêm sendo aplicado.

Conclusões e Perspectivas

A metodologia de indução de isquemia e reperfusão focais, por oclusão intraluminal transitória da artéria cerebral média em camundongos foi estabelecida com sucesso. A partir da implementação desse modelo de isquemia cerebral induzido pela cirurgia, estabelecemos as outras metodologias complementares para a avaliação das alterações sensório-motoras, como a avaliação do escore neurológico, o teste de força dos membros dianteiros e a análise de detalhes finos da marcha pelo sistema *CatWalk*. Em relação ao estudo de curto prazo (avaliação durante os 2 dias pós cirúrgicos), o LDT11 mostrou um efeito significativo, mesmo que pequeno, na prevenção da redução da força dos animais isquêmicos. Essa substância também mostrou um efeito de reduzir significativamente o déficit neurológico avaliado pela redução do escore neurológico. Talvez o seu efeito mais relevante foi de reduzir significativamente a mortalidade em relação ao grupo Veículo. O LDT13 só mostrou efeito significativo de reduzir a mortalidade dos animais em relação ao grupo Veículo. Ambas as substâncias avaliadas nesse estudo não apresentaram efeitos de reduzir o volume de infarto e de prevenir a perda de massa corpórea decorrente da isquemia cerebral. Em relação ao estudo de longo prazo (28 dias pós cirúrgicos) encontramos que a média das taxas da área de

impressão das patas posteriores do grupo Falso Operado (FO) foi significativamente maior do que a do grupo Veículo.

Como perspectiva inclui-se a análise de detalhes finos das pegadas dos animais, como as distâncias entre os dedos, no próprio sistema *CatWalk*. Estas análises fornecem mais detalhes sobre alterações motoras que talvez não tenham surgido na análise já realizada da marcha dos animais. Também será necessário o uso simultâneo de outro teste funcional melhor validado que o *CatWalk*, que ainda foi pouco usado em modelos de AVE. Pode-se buscar aumentar o tempo de isquemia no grupo de longo prazo sem reduzir significativamente a viabilidade dos animais. Com isso, talvez possamos encontrar déficits sensório-motores mais pronunciados para a avaliação de tratamentos farmacológicos a longo prazo.

Referências

Gray Anatomia. 37 ed., Londres, p. 1022, 1995.

A.D.A.M.MEDICAL ENCYCLOPEDIA. Stroke. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0001740/, acesso em: 2013.

ABRAKI, S.B., KHALAJ, L., SHAERZADEH, F. e KHODAGHOLI, F. Simultaneous inhibition of COX-2 and activation of PPAR-gamma resulted in the same level and pattern of neuroprotection as they were targeted separately. **J. Mol. Neurosci.**, vol. 49, p. 116-129, 2013.

AHMAD, M., ZHANG, Y., LIU, H., ROSE, M.E. e GRAHAM, S.H. Prolonged opportunity for neuroprotection in experimental stroke with selective blockade of cyclooxygenase-2 activity. **Brain Res**, vol. 1279, p. 168-173, 2009.

ALBERS, G.W., GOLDSTEIN, L.B., HESS, D.C., WECHSLER, L.R., FURIE, K.L., GORELICK, P.B., HURN, P., LIEBESKIND, D.S., NOGUEIRA, R.G. e SAVER, J.L. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. **Stroke**, vol. 42, p. 2645-2650, 2011.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. e WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. São Paulo, p. G-19, 2008a.

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. e WALTER, P. Mecanismos da Comunicação Celular. In: **Biologia Molecular da Célula**. São Paulo, 2008b.
- AMORIM, F.E. **Avaliação de Neurodegeneração e Sequelas Neurológicas Secundárias à Isquemia Cerebral Focal em Camundongos BALB/c**. Monografia de Bacharel (Ciências Biológicas - Biofísica) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- BALASUBRAMANYAM, K., SWAMINATHAN, V., RANGANATHAN, A. e KUNDU, T.K. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. **J. Biol. Chem.**, vol. 278, p. 19134-19140, 2003.
- BALKAYA, M., KROBER, J., GERTZ, K., PERUZZARO, S. e ENDRES, M. Characterization of long-term functional outcome in a murine model of mild brain ischemia. **J. Neurosci. Methods**, vol. 213, p. 179-187, 2013.
- BAZAN, N.G., HALABI, A., ERTEL, M. e PETASIS, N.A. Neuroinflammation. In: **Basic Neurochemistry, Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology**. 8 ed., Elsevier Inc, Amsterdam, 2012.
- BELAYEV, L., ALONSO, O.F., BUSTO, R., ZHAO, W. e GINSBERG, M.D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. **Stroke**, vol. 27, p. 1616-1622, 1996.
- BELAYEV, L., LU, Y. e BAZAN, N.G. Brain Ischemia and Reperfusion: Cellular and Molecular Mechanisms in Stroke Injury. In: **Basic Neurochemistry, Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology**. Elsevier Inc, Amsterdam, 2012.
- BLOCK, F. Global ischemia and behavioural deficits. **Prog. Neurobiol.**, vol. 58, p. 279-295, 1999.
- BOUET, V., FRERET, T., TOUTAIN, J., DIVOUX, D., BOULOUARD, M. e SCHUMANN-BARD, P. Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. **Exp. Neurol.**, vol. 203, p. 555-567, 2007.
- BROTT, T., ADAMS, H.P., Jr., OLINGER, C.P., MARLER, J.R., BARSAN, W.G., BILLER, J., SPILKER, J., HOLLERAN, R., EBERLE, R., HERTZBERG, V. e . Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. **Stroke**, vol. 20, p. 864-870, 1989.

- CARLBERG, C. e MOLNÁR, F. **Mechanisms of Gene Regulation**. New York, p. 24, 2014.
- CASTELLANOS, M., SOBRINO, T. e CASTILLO, J. Evolving paradigms for neuroprotection: molecular identification of ischemic penumbra. **Cerebrovasc. Dis.**, vol. 21 Suppl 2, p. 71-79, 2006.
- CHEN, J., CHUA, K.W., CHUA, C.C., YU, H., PEI, A., CHUA, B.H., HAMDY, R.C., XU, X. e LIU, C.F. Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. **Neurosci. Lett.**, vol. 499, p. 181-185, 2011.
- CHEN, T.Y., LIN, M.H., LEE, W.T., HUANG, S.Y., CHEN, Y.H., LEE, A.C., LIN, H.W. e LEE, E.J. Nicotinamide inhibits nuclear factor-kappa B translocation after transient focal cerebral ischemia. **Crit Care Med.**, vol. 40, p. 532-537, 2012.
- CHIANG, T., MESSING, R.O. e CHOU, W.H. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. **J. Vis. Exp.**, 2011.
- COSTA, L.G. Neurotoxicology. In: **Current Protocols in Toxicology**. Costa, L.G., Hodgson, E., Lawrence, D.A., Reed, D.J., e Greenlee, W.F. Washington, 2005.
- DATASUS. Mortalidade do adulto no Brasil: taxas de mortalidade segundo o sexo, as causas e as regiões. Disponível em: portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/21/saudebrasil2011_parte1_cap7.pdf, acesso em: 2010.
- DATASUS. AVC: governo alerta para principal causa de mortes. Disponível em: portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/2866-, acesso em: 2012.
- DE CARVALHO, J.J., ALVES, M.B., VIANA, G.A., MACHADO, C.B., DOS SANTOS, B.F., KANAMURA, A.H., LOTTENBERG, C.L., NETO, M.C. e SILVA, G.S. Stroke epidemiology, patterns of management, and outcomes in Fortaleza, Brazil: a hospital-based multicenter prospective study. **Stroke**, vol. 42, p. 3341-3346, 2011.
- DIRNAGL, U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 26, p. 1465-1478, 2006.
- DONNAN, G.A., BARON, J.C., DAVIS, S.M. e SHARP, F.R. The Ischemic Penumbra: Overview, Definition, and Criteria. In: **The Ischemic Penumbra**. New York, 2007.

- DORR, A., SLED, J.G. e KABANI, N. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. **Neuroimage.**, vol. 35, p. 1409-1423, 2007.
- DURUKAN, A. e TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 87, p. 179-197, 2007.
- ELIAS, M.J.G. **Avaliação do Efeito Neuroprotetor da Probenecida na Lesão Neural Excitotóxica e Isquêmica.** Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- ENCARNACION, A., HORIE, N., KEREN-GILL, H., BLISS, T.M., STEINBERG, G.K. e SHAMLOO, M. Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. **J. Neurosci. Methods**, vol. 196, p. 247-257, 2011.
- ENGEL, O., KOLODZIEJ, S., DIRNAGL, U. e PRINZ, V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. **J. Vis. Exp.**, 2011.
- FENG, C.S., MA, H.C., YUE, Y., ZHANG, Y.Q. e QU, X.D. [Effect of propofol on the activation of nuclear factor-kappa B and expression of inflammatory cytokines in cerebral cortex during transient focal cerebral ischemia-reperfusion: experiment with rats]. **Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.**, vol. 84, p. 2110-2114, 2004.
- FERRARA, A., EL, B.S., SEYEN, S., TIRELLI, E. e PLUMIER, J.C. The usefulness of operant conditioning procedures to assess long-lasting deficits following transient focal ischemia in mice. **Behav. Brain Res.**, vol. 205, p. 525-534, 2009.
- FLURI, F., SCHUHMANN, M.K. e KLEINSCHNITZ, C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. **Drug Design, Development and Therapy**, vol. 9, p. 3445-3454, 2015.
- FROSCH, M.P., ANTHONY, D.C. e GIROLAMI, U. The Central Nervous System. In: **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.** 7 ed., Philadelphia, 2005.
- GAO, B., KILIC, E., BAUMANN, C.R., HERMANN, D.M. e BASSETTI, C.L. Gamma-hydroxybutyrate accelerates functional recovery after focal cerebral ischemia. **Cerebrovasc. Dis.**, vol. 26, p. 413-419, 2008.
- GHIZZONI, M., HAISMA, H.J., MAARSINGH, H. e DEKKER, F.J. Histone acetyltransferases are crucial regulators in NF-kappaB mediated inflammation. **Drug Discov. Today**, vol. 16, p. 504-511, 2011.

GINSBERG, M.D. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. **Stroke**, vol. 40, p. S111-S114, 2009.

GONZAGA, W.A. **Preparação e Avaliação Farmacológica de Derivados dos Lipídios Fenólicos do Líquido da Casca da Castanha de Caju**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

GRAZZINI, R., HESK, D., HEININGER, E., HILDENBRANDT, G., REDDY, C.C., COX-FOSTER, D., MEDFORD, J., CRAIG, R. e MUMMA, R.O. Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, vol. 176, p. 775-780, 1991.

GREEN, A.R. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. **Br J. Pharmacol.**, vol. 153 Suppl 1, p. S325-S338, 2008.

GU, J.H., GE, J.B., LI, M., WU, F., ZHANG, W. e QIN, Z.H. Inhibition of NF-kappaB activation is associated with anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury. **Eur. J. Pharm. Sci.**, vol. 47, p. 652-660, 2012.

GUEGAN, C., CEBALLOS-PICOT, I., NICOLE, A., KATO, H., ONTENIENTE, B. e SOLA, B. Recruitment of several neuroprotective pathways after permanent focal ischemia in mice. **Exp. Neurol.**, vol. 154, p. 371-380, 1998.

GUTIERREZ, M., DIEZ, T.E., ONSO DE, L.M., FUENTES, B., CARCELLER, F. e RODA, J.M. Thrombolysis and neuroprotection in cerebral ischemia. **Cerebrovasc. Dis.**, vol. 21 Suppl 2, p. 118-126, 2006.

GWAG, B.J., WON, S.J. e KIM, D.Y. Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Apoptosis in Ischemic Neuronal Death. Boca Raton, p. 98, 2002.

HA, T.J. e KUBO, I. Lipoxygenase inhibitory activity of anacardic acids. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 53, p. 4350-4354, 2005.

HAMAD, F.B. e MUBOFU, E.B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **Int. J. Mol. Sci.**, vol. 16, p. 8569-8590, 2015.

HARUKUNI, I. e BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurol. Clin.**, vol. 24, p. 1-21, 2006.

HEART & STROKE FOUNDATION. Stroke prevention and risk factors. Disponível em: www.heartandstroke.com/site/c.ikiQLcMWJtE/b.3483939/k.16FB/Stroke__Stroke_prevention_and_risk_factors.htm, acesso em: 2012.

HEART AND STROKE FOUNDATION. High blood pressure during pregnancy could elevate the risk of a future stroke. Disponível em: www.heartandstroke.com/site/apps/nlnet/content2.aspx?c=ikiQLcMWJtE&b=8846529&ct=13370261, acesso em: 2013.

HEMSHEKHAR, M., SEBASTIN, S.M., KEMPARAJU, K. e GIRISH, K.S. Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, 2011.

HOFFMANN, A. e BALTIMORE, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. **Immunol. Rev.**, vol. 210, p. 171-186, 2006.

HSIA, A.W. e ALBERS, G.W. Advances in the Acute Treatment and Secondary Prevention of Stroke. In: **From Neuroscience to Neurology**. 1 ed., Waxman, S. 2005.

HUANG, J., CHOUDHRI, T.F., WINFREE, C.J., MCTAGGART, R.A., KISS, S., MOCCO, J., KIM, L.J., PROTOPSALTIS, T.S., ZHANG, Y., PINSKY, D.J. e CONNOLLY, E.S., Jr. Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. **Stroke**, vol. 31, p. 3047-3053, 2000.

IADECOLA, C. e ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat. Med.**, vol. 17, p. 796-808, 2011.

IOROI, T., TAGUCHI, K., IZUMI, Y., TAKADA-TAKATORI, Y., AKAIKE, A. e KUME, T. Protective effect of serofendic acid, administered intravenously, on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Brain Res**, vol. 1532, p. 99-105, 2013.

ISHIZAKI, T., ERICKSON, A., KURIC, E., SHAMLOO, M., HARA-NISHIMURA, I., INACIO, A.R., WIELOCH, T. e RUSCHER, K. The asparaginyl endopeptidase legumain after experimental stroke. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 30, p. 1756-1766, 2010.

JACOBSON, S. e MARCUS, E.M. **Neuroanatomy for the Neuroscientist**. New York, p. 17-18, 2008.

KANG, S.S., KEASEY, M.P., ARNOLD, S.A., REID, R., GERALDS, J. e HAGG, T. Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice. **Neurobiol. Dis.**, vol. 49C, p. 68-78, 2012.

- KANG, S.S., KEASEY, M.P., ARNOLD, S.A., REID, R., GERALDS, J. e HAGG, T. Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice. **Neurobiol. Dis.**, vol. 49, p. 68-78, 2013.
- KARIN, M. e BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. **Annu. Rev. Immunol.**, vol. 18, p. 621-663, 2000.
- KILIC, E., KILIC, U., BACIGALUPPI, M., GUO, Z., ABDALLAH, N.B., WOLFER, D.P., REITER, R.J., HERMANN, D.M. e BASSETTI, C.L. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. **J. Pineal Res**, vol. 45, p. 142-148, 2008.
- KIM, M.K., LEE, S., KIM, E.J., KONG, K.H., LEE, D.H. e CHUNG, J.H. Topical application of anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid) reduces UV-induced histone modification, MMP-13, MMP-9, COX-2 and TNF-alpha expressions in hairless mice skin. **J. Dermatol. Sci.**, vol. 70, p. 64-67, 2013.
- KUBO, I., MASUOKA, N., HA, T.J. e TSUJIMOTO, K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, vol. 99, p. 555-562, 2006.
- LAI, T.W., ZHANG, S. e WANG, Y.T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. **Prog. Neurobiol.**, vol. 115, p. 157-188, 2014.
- LEES, K.R. Management of acute stroke. **Lancet Neurol.**, vol. 1, p. 41-50, 2002.
- LEKER, R.R. e SHOHAMI, E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, vol. 39, p. 55-73, 2002.
- LINDEN, J., FASSOTTE, L., TIRELLI, E., PLUMIER, J.C. e FERRARA, A. Assessment of behavioral flexibility after middle cerebral artery occlusion in mice. **Behav. Brain Res**, vol. 258, p. 127-137, 2014.
- LIU, F., SCHAFER, D.P. e MCCULLOUGH, L.D. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. **J. Neurosci. Methods**, vol. 179, p. 1-8, 2009.
- LIU, L., DORAN, S., XU, Y., MANWANI, B., RITZEL, R., BENASHSKI, S., MCCULLOUGH, L. e LI, J. Inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) increases experimental stroke injury. **Exp. Neurol.**, vol. 261, p. 404-411, 2014.

- LONGA, E.Z., WEINSTEIN, P.R., CARLSON, S. e CUMMINS, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke**, vol. 20, p. 84-91, 1989.
- MASUOKA, N. e KUBO, I. Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1688, p. 245-249, 2004.
- MAYNE, M., NI, W., YAN, H.J., XUE, M., JOHNSTON, J.B., DEL BIGIO, M.R., PEELING, J. e POWER, C. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor-alpha expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. **Stroke**, vol. 32, p. 240-248, 2001.
- MAZZETTO, S.E., LOMONACO, D. e MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, vol. 32, p. 732-741, 2009.
- MEISEL, C., PRASS, K., BRAUN, J., VICTOROV, I., WOLF, T., MEGOW, D., HALLE, E., VOLK, H.D., DIRNAGL, U. e MEISEL, A. Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. **Stroke**, vol. 35, p. 2-6, 2004.
- MINNERUP, J., SUTHERLAND, B.A., BUCHAN, A.M. e KLEINSCHNITZ, C. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. **Int. J. Mol. Sci.**, vol. 13, p. 11753-11772, 2012.
- MOLINA, C.A. Reperfusion therapies for acute ischemic stroke: current pharmacological and mechanical approaches. **Stroke**, vol. 42, p. S16-S19, 2011.
- MUIR, K.W. Stroke. **Medicine**, vol. 41, 2013.
- MUNHOZ, C.D., GARCIA-BUENO, B., MADRIGAL, J.L., LEPSCH, L.B., SCAVONE, C. e LEZA, J.C. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. **Braz. J. Med. Biol. Res**, vol. 41, p. 1037-1046, 2008.
- NADA, S.E., TULSULKAR, J., RAGHAVAN, A., HENSLEY, K. e SHAH, Z.A. A derivative of the CRMP2 binding compound lanthionine ketimine provides neuroprotection in a mouse model of cerebral ischemia. **Neurochem. Int**, vol. 61, p. 1357-1363, 2012.
- NAKKA, V.P., GUSAIN, A., MEHTA, S.L. e RAGHUBIR, R. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. **Mol. Neurobiol.**, vol. 37, p. 7-38, 2008.

O'COLLINS, V.E., MACLEOD, M.R., DONNAN, G.A., HORKY, L.L., VAN DER WORP, B.H. e HOWELLS, D.W. 1,026 experimental treatments in acute stroke. **Ann. Neurol.**, vol. 59, p. 467-477, 2006.

OKADA, Y., COPELAND, B.R., MORI, E., TUNG, M.M., THOMAS, W.S. e DEL ZOPPO, G.J. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. **Stroke**, vol. 25, p. 202-211, 1994.

OLIVEIRA, M.S., MORAIS, S.M., MAGALHAES, D.V., BATISTA, W.P., VIEIRA, I.G., CRAVEIRO, A.A., DE MANEZES, J.E., CARVALHO, A.F. e DE LIMA, G.P. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Trop.**, vol. 117, p. 165-170, 2011.

OLSEN, T.S. Regional cerebral blood flow after occlusion of the middle cerebral artery. **Acta Neurol. Scand.**, vol. 73, p. 321-337, 1986.

OMS. Stroke, Cerebrovascular accident. Disponível em: **www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/**, acesso em: 2013.

OMS. Deaths from stroke. Disponível em: **www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_16_death_from_stroke.pdf?ua=1.**, acesso em: 2014a.

OMS. Global burden of stroke. Disponível em: **www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_15_burden_stroke.pdf?ua=1**, acesso em: 2014b.

OMS. The top 10 causes of death. Disponível em: **www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html**, acesso em: 2014c.

PANIKASHVILI, D., MECHOULAM, R., BENI, S.M., ALEXANDROVICH, A. e SHOHAMI, E. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 25, p. 477-484, 2005.

PARE, J.R. e KAHN, J.H. Basic neuroanatomy and stroke syndromes. **Emerg. Med. Clin. North Am.**, vol. 30, p. 601-615, 2012.

PARKKINEN, S., ORTEGA, F.J., KUPTSOVA, K., HUTTUNEN, J., TARKKA, I. e JOLKKONEN, J. Gait impairment in a rat model of focal cerebral ischemia. **Stroke Res. Treat.**, vol. 2013, p. 410972, 2013.

- PAXINOS, G. e FRANKLIN, K.B.J. **The Mouse Brain In Stereotaxic Coordinates**. 2 ed., San Diego, 2001.
- PERKINS, N.D. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. **Trends Biochem. Sci.**, vol. 25, p. 434-440, 2000.
- PESSOA, P.F.A.P. e LEITE, L.A.S. Cadeia Produtiva do Caju: subsídios para pesquisa e desenvolvimento. Disponível em: **www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_582.pdf**, acesso em: 2013.
- PRASS, K., MEISEL, C., HOFLICH, C., BRAUN, J., HALLE, E., WOLF, T., RUSCHER, K., VICTOROV, I.V., PRILLER, J., DIRNAGL, U., VOLK, H.D. e MEISEL, A. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. **J. Exp. Med.**, vol. 198, p. 725-736, 2003.
- PRINZ, V. e ENDRES, M. Modeling Focal Cerebral Ischemia in Rodents: Introduction and Overview. In: **Rodent Models of Stroke**. Dirnagl, U. Berlin, 2010.
- PRINZ, V., KÖNIG, J., JI, S., LINDAUER, U., REX, A. e DIRNAGL, U. SOP for middle cerebral artery occlusion (MCAO). Disponível em: **precedings.nature.com/documents/3492/version/3/files/npre20123492-3.pdf**, acesso em: 2013.
- RAMOS-CABRER, P., CAMPOS, F., SOBRINO, T. e CASTILLO, J. Targeting the ischemic penumbra. **Stroke**, vol. 42, p. S7-11, 2011.
- RIBEIRO, R.P., MOREIRA, E.L., SANTOS, D.B., COLLE, D., DOS SANTOS, A.A., PERES, K.C., FIGUEIREDO, C.P. e FARINA, M. Probucol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochem. Res**, vol. 38, p. 660-668, 2013.
- RUAN, L., HUANG, H.S., JIN, W.X., CHEN, H.M., LI, X.J. e GONG, Q.J. Tetrandrine Attenuated Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury and Induced Differential Proteomic Changes in a MCAO Mice Model Using 2-D DIGE. **Neurochem. Res**, 2013.
- SCHULTE-HERBRUGGEN, O., KLEHMET, J., QUARCOO, D., MEISEL, C. e MEISEL, A. Mouse strains differ in their susceptibility to poststroke infections. **Neuroimmunomodulation.**, vol. 13, p. 13-18, 2006.
- SEONG, A.R., YOO, J.Y., CHOI, K., LEE, M.H., LEE, Y.H., LEE, J., JUN, W., KIM, S. e YOON, H.G. Delphinidin, a specific inhibitor of histone acetyltransferase,

suppresses inflammatory signaling via prevention of NF-kappaB acetylation in fibroblast-like synoviocyte MH7A cells. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, vol. 410, p. 581-586, 2011.

SERENA, J., RODRIGUEZ-YANEZ, M. e CASTELLANOS, M. Deterioration in acute ischemic stroke as the target for neuroprotection. **Cerebrovasc. Dis.**, vol. 21 Suppl 2, p. 80-88, 2006.

SHI, S.S., YANG, W.Z., TU, X.K., WANG, C.H., CHEN, C.M. e CHEN, Y. 5-lipoxygenase inhibitor zileuton inhibits neuronal apoptosis following focal cerebral ischemia. **Inflammation**, vol. 36, p. 1209-1217, 2013.

SHICHITA, T., SAKAGUCHI, R., SUZUKI, M. e YOSHIMURA, A. Post-ischemic inflammation in the brain. **Front Immunol.**, vol. 3, p. 132, 2012.

SMITH, H.K., RUSSELL, J.M., GRANGER, D.N. e GAVINS, F.N.E. Critical differences between two classical surgical approaches for middle cerebral artery occlusion-induced stroke in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 249, p. 99-105, 2015.

SMITH, W.S., JOHNSTON, S.C. e EASTON, J.D. Cerebrovascular Diseases. In: **Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition**. 16 ed., New York, 2004.

STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE(STAIR).
Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. **Stroke**, vol. 30, p. 2752-2758, 1999.

SUNG, B., PANDEY, M.K., AHN, K.S., YI, T., CHATURVEDI, M.M., LIU, M. e AGGARWAL, B.B. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. **Blood**, vol. 111, p. 4880-4891, 2008.

SWANSON, R.A., MORTON, M.T., TSAO-WU, G., SAVALOS, R.A., DAVIDSON, C. e SHARP, F.R. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, vol. 10, p. 290-293, 1990.

TAKAMIYA, M., MIYAMOTO, Y., YAMASHITA, T., DEGUCHI, K., OHTA, Y. e ABE, K. Strong neuroprotection with a novel platinum nanoparticle against ischemic stroke- and tissue plasminogen activator-related brain damages in mice. **Neuroscience**, vol. 221, p. 47-55, 2012.

- TAKUWA, H., MATSUURA, T., OBATA, T., KAWAGUCHI, H., KANNO, I. e ITO, H. Hemodynamic changes during somatosensory stimulation in awake and isoflurane-anesthetized mice measured by laser-Doppler flowmetry. **Brain Res**, vol. 1472, p. 107-112, 2012.
- TEISMANN, P. e FERGER, B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. **Synapse**, vol. 39, p. 167-174, 2001.
- TRIBUTINO, J.L.M. **Estudo do Perfil Antiinflamatório e Neuroprotetor de Novos Análogos do Composto LASSBio 294**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- TRUEMAN, R.C., HARRISON, D.J., DWYER, D.M., DUNNETT, S.B., HOEHN, M. e FARR, T.D. A Critical Re-Examination of the Intraluminal Filament MCAO Model: Impact of External Carotid Artery Transection. **Transl. Stroke Res**, vol. 2, p. 651-661, 2011.
- VAN LEYEN K. Lipoxygenase: an emerging target for stroke therapy. **CNS. Neurol. Disord. Drug Targets.**, vol. 12, p. 191-199, 2013.
- WANG, J., FENG, X., DU, Y., WANG, L. e ZHANG, S. Combination treatment with progesterone and rehabilitation training further promotes behavioral recovery after acute ischemic stroke in mice. **Restor. Neurol. Neurosci.**, vol. 31, p. 487-499, 2013.
- WANG-FISHER, Y. **Manual of Stroke Models in Rats**. CRC Press, Boca Raton, 2009.
- WANG-FISHER, Y., PRADO, R. e KOETZNER, L. **Anatomy and Cerebral Circulation of the Rat**. Boca Raton, 2008.
- WILLETTE, R.N., SAUERMECH, C., EZEKIEL, M., FEUERSTEIN, G. e OHLSTEIN, E.H. Effect of endothelin on cortical microvascular perfusion in rats. **Stroke**, vol. 21, p. 451-458, 1990.
- WISASTRA, R., KOK, P.A., ELEFThERIADIS, N., BAUMGARTNER, M.P., CAMACHO, C.J., HAISMA, H.J. e DEKKER, F.J. Discovery of a novel activator of 5-lipoxygenase from an anacardic acid derived compound collection. **Bioorg. Med. Chem.**, vol. 21, p. 7763-7778, 2013.

- WONG, R., GIBSON, C.L., KENDALL, D.A. e BATH, P.M.W. Evaluating the translational potential of progesterone treatment following transient cerebral ischaemia in male mice. **Bmc Neuroscience**, vol. 15, 2014.
- YANG, Y., SHUAIB, A. e LI, Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. **J. Neurosci. Methods**, vol. 84, p. 9-16, 1998.
- 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. e VAN, L.K. Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. **Ann. Neurol.**, vol. 73, p. 129-135, 2013.
- YILDIRIM, F., JI, S., KRONENBERG, G., BARCO, A., OLIVARES, R., BENITO, E., DIRNAGL, U., GERTZ, K., ENDRES, M., HARMS, C. e MEISEL, A. Histone acetylation and CREB binding protein are required for neuronal resistance against ischemic injury. **PLoS. One.**, vol. 9, p. e95465, 2014.
- YIN, M.J., YAMAMOTO, Y. e GAYNOR, R.B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. **Nature**, vol. 396, p. 77-80, 1998.
- ZHANG, Y.C., GAN, F.F., SHELAR, S.B., NG, K.Y. e CHEW, E.H. Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. **Food Chem. Toxicol.**, vol. 59, p. 272-280, 2013.
- ZHOU, W., LIESZ, A., BAUER, H., SOMMER, C., LAHRMANN, B., VALOUS, N., GRABE, N. e VELTKAMP, R. Postischemic brain infiltration of leukocyte subpopulations differs among murine permanent and transient focal cerebral ischemia models. **Brain Pathol.**, vol. 23, p. 34-44, 2013.
- ZOU, J.Y. e CREWS, F.T. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. **Brain Res**, vol. 1034, p. 11-24, 2005.

APÊNDICE A – GRÁFICOS DAS ANÁLISES DO SISTEMA CATWALK

