

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

MAIARA DE AGUIAR DA COSTA

**EFEITOS DA MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA INFANTIL INDUZIDA
POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM UM MODELO ANIMAL DE
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2024

MAIARA DE AGUIAR DA COSTA

**EFEITOS DA MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA INFANTIL INDUZIDA
POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM UM MODELO ANIMAL DE
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabrícia Cardoso Petronilho
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cinara Ludvig Gonçalves

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C837e Costa, Maiara de Aguiar da.
Efeitos da modulação imunológica infantil
induzida por lipopolissacarídeo em um modelo animal
de acidente vascular cerebral isquêmico / Maiara de
Aguiar da Costa. - 2024.
58 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo
Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Fabrícia Cardoso Petronilho.

Coorientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

1. AVC Isquêmico. 2. Lipopolissacarídeos. 3.
Sistema imunitário. 4. Estresse oxidativo. I.
Título.

CDD. 22. ed. 616.81

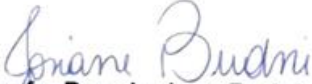
Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



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

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 455

Com início às 12 (doze) horas e 30 (trinta) minutos do dia 17 (dezessete) de dezembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), realizou-se, na Sala 225/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **MAIARA DE AGUIAR DA COSTA**, sob a orientação da **Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho** e coorientação da **Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves**, intitulada “**EFEITOS DA MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA INFANTIL INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM UM MODELO ANIMAL DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Tamy Colonetti (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Lucinéia Gainski Danielski (The University of Texas Medical Branch) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze) horas, dos quais eu, Henrique Manenti Felisberto, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 17 (dezessete) de dezembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro).


Profa. Dra. Josiane Budni
Coordenadora do PPGCS


Henrique Manenti Felisberto
Secretário do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada seguindo a resolução n. 05/2024 do Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Doenças Cerebrovasculares do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

O caminho percorrido até a conclusão desta dissertação foi marcado por desafios, diversão, aprendizado e crescimento, e nada disso teria sido possível sem as bênçãos recebidas por Ele e sem o apoio de tantas pessoas especiais.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Fabrícia e co-orientadora Cinara, que sempre me acolheram, guiaram e impulsionaram. Vocês sempre estarão no meu coração! Gostaria de agradecer também, a todos os meus amigos e colegas que encontrei enquanto percorri o DCeV (Carlinha, Khiany, Anita, David, Sandra, Lari, Victor, Fabrício, Richard e Paulo) e o LAND (Sofi, Flávia, Maria Fernanda, Germano, Leo, Nathan, Giseli, Maria Júlia e Gizela), o que acabou trazendo outras pessoas especiais (Adry, Guga, Luize, Carol, Cris, Amanda, Eloá e Isa). Todos vocês dividiram grande parte dos momentos bons e ruins da vida, dos projetos e experimentos e isso tornou tudo melhor. Obrigada por cada pela troca de conhecimento, pelo incentivo mútuo e pelas discussões que tanto contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à minha família, pelo amor incondicional, pela paciência e pelo suporte em todos os momentos. Aos meus pais, Sérgio e Claudete, por sempre acreditarem e incentivarem a seguir meus sonhos, mesmo quando o caminho parecia difícil para todos nós. Aos meus irmãos, Matheus e Marcos, por estarem ao meu lado com palavras de incentivo e piadas para deixar tudo mais leve. E agradeço às minhas cunhadas, Vitória e Letícia, que sempre torceram por mim e me deram palavras acalentadoras. À minha sobrinha, Lara, que mesmo tão pequena deixou a vida de nós todos, muito mais divertida e gostosa de ser vivida. Ao meu namorado Gustavo, por ser meu porto seguro em todos os momentos e à família dele (Mari, Jane e Roberto) que também virou minha.

Aos amigos, que foram minha rede de apoio nos momentos de estresse e exaustão e que estavam sempre prontos para comemorar as pequenas e grandes conquistas. Inicialmente, gostaria de deixar minha gratidão às minhas amigas de infância, Carol (também minha prima), Joana, Débora, Bia, Emellyn e Suellen por serem minha válvula de escape da bolha do mundo acadêmico e por compartilharem comigo momentos incríveis das nossas vidas. E às amigas que fiz na minha jornada acadêmica, mas que foram além dela. Vic, Laurinha e Duda, não consigo imaginar como teria sido a trajetória sem vocês. A todos, muito obrigada por cada conversa, por cada risada e por me lembrarem de que eu nunca estava sozinha nessa caminhada.

Por fim, agradeço a todo o PPGCS, principalmente às coordenadoras e Josi e Samira, e aos secretários Samiris e Henrique que me atenderam sempre com muito carinho e atenção. Agradeço a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio que facilitou a concretização deste sonhos e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação.

A todos vocês, minha mais profunda gratidão.

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma doença de sinais clínicos súbitos causada por interrupção repentina do fluxo sanguíneo cerebral com duração superior a 24 horas. No Brasil, desde 2019, o AVC é a principal causa de morte hospitalar e a sua prevalência no mundo entre 2017 e 2020 foi de 3,3% e aproximadamente 87% foram AVC isquêmico (AVCi). O quadro de AVCi desenvolve um conjunto de fenômenos que levam a lesões na barreira hematoencefálica, estresse oxidativo, apoptose, neuroinflamação e desequilíbrio iônico, causando danos neuronais. Se tratando da modulação imune, ao longo dos anos tem se investigado o papel da modulação imunológica infantil, a fim de diminuir a resposta inflamatória exacerbada para um segundo insulto em diversas doenças. Nesse contexto, crianças expostas a germes na infância, conseguem programar o sistema imunológico para não reagir exageradamente frente a um insulto inflamatório ou infeccioso na idade adulta. Isso vai de encontro ao que dita a teoria da higiene ou teoria dos velhos amigos, mas ainda não se sabe se esta teoria possui validade sobre o desfecho do AVCi. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da modulação imunológica induzida por lipopolissacarídeo (LPS) durante o período da infância no desfecho do AVCi ocorrido na idade adulta de ratos *Wistar* machos. Para isto, ratos *Wistar* machos receberam 50 µg/Kg de LPS via intraperitoneal, durante 4 dias consecutivos, do dia pós-natal (DPN) 14 até o DPN 17, formando 4 grupos: I) SAL+SHAM; II) SAL+ oclusão da artéria cerebral média (MCAO); III) LPS+SHAM e IV) LPS+MCAO. Durante o período de desenvolvimento os animais foram avaliados quanto ao neurodesenvolvimento (peso e geotaxia negativa) e no DPN 60 foram submetidos ao modelo animal de AVCi, induzido por MCAO. Em uma e vinte e quatro horas após a isquemia foi verificado o escore neurológico e em seguida os animais foram eutanasiados para retirada das estruturas cerebrais, córtex frontal e hipocampo, para a realização de análises bioquímicas. A exposição infantil ao LPS diminuiu o tempo necessário para o animal girar 180° na geotaxia negativa, além do ganho de peso dos animais tratados com LPS. No escore neurológico foi observado que os animais submetidos ao MCAO demonstraram maior déficit neurológico em comparação ao grupo controle em uma e 24 horas após o MCAO. No córtex frontal, animais LPS+MCAO exibiram aumento de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e redução de IL-10; no hipocampo, TNF- α e IL-6 aumentaram, enquanto IL-10 diminuiu. Nos parâmetros de estresse oxidativo, a atividade da enzima mieloperoxidase foi aumentada no grupo submetido ao MCAO nas duas estruturas e no grupo exposto ao LPS e MCAO no córtex frontal em comparação ao grupo controle. Já a concentração de nitrato/nitrito foi aumentada em córtex frontal no grupo submetido ao MCAO. Quanto a defesa antioxidante, a atividade da enzima superóxido dismutase foi diminuída no hipocampo dos grupos expostos ao LPS e/ou submetidos ao MCAO. Já a atividade da enzima catalase diminuiu em córtex frontal no grupo submetido somente ao MCAO ou LPS. No hipocampo dos grupos submetidos ao MCAO a atividade enzimática foi diminuída, mas o grupo somente exposto ao LPS permaneceu com a atividade inalterada. Em relação ao dano de lipídeos, os animais submetidos somente ao MCAO mostraram o parâmetro de malondialdeído (MDA) equivalente elevado. Por fim, no conteúdo de sulfidrilas, apenas os grupos submetidos ao MCAO apresentaram diminuição. O LPS atenuou a concentração de nitrato/nitrito e manteve a atividade da enzima CAT no córtex frontal, assim como diminuiu o MDA no hipocampo dos animais submetidos ao MCAO. Os dados sugerem que o modelo MCAO gera déficit cognitivo, inflamação e estresse oxidativo que fazem parte da fisiopatologia da doença e que a exposição ao LPS na infância modula parcialmente alterações bioquímicas, mas não impede o impacto do MCAO, indicando a necessidade de estudos sobre imunidade treinada e inflamação exacerbada após insultos.

Palavras-chave: LPS; AVC; cerebrovascular; desenvolvimento; imunidade.

ABSTRACT

Stroke is a sudden clinical condition caused by an abrupt interruption of cerebral blood flow lasting more than 24 hours. In Brazil, since 2019, stroke has been the leading cause of hospital death. Its global prevalence between 2017 and 2020 was 3.3%, with approximately 87% being ischemic strokes (IS). The IS condition triggers a series of phenomena, including blood-brain barrier disruption, oxidative stress, apoptosis, neuroinflammation, and ionic imbalance, ultimately causing neuronal damage. Regarding immune modulation, the role of early-life immune programming has been investigated over the years as a means to reduce the exacerbated inflammatory response to a second insult in various diseases. In this context, children exposed to germs during childhood may "train" their immune system to avoid overreacting to inflammatory or infectious challenges in adulthood. This goes against what is proposed by the hygiene hypothesis or "old friends" hypothesis. However, it remains unclear whether this theory applies to the outcomes of IS. Thus, the objective of this study was to investigate the effect of immune modulation induced by lipopolysaccharide (LPS) during childhood on the outcomes of IS in adult male Wistar rats. For this, male Wistar rats received 50 µg/kg of LPS intraperitoneally for 4 consecutive days, from postnatal day (PND) 14 to PND 17, forming four groups: I) SAL+SHAM; II) SAL+middle cerebral artery occlusion (MCAO); III) LPS+SHAM; and IV) LPS+MCAO. During the development period, animals were assessed for neurodevelopment (weight and negative geotaxis). At PND 60, they underwent an animal model of IS induced by MCAO. Neurological scores were assessed 1 and 24 hours after ischemia, after which the animals were euthanized, and brain structures (frontal cortex and hippocampus) were collected for biochemical analyses. Childhood exposure to LPS reduced the time required for animals to turn 180° in the negative geotaxis test and influenced the weight gain of LPS-treated animals. Neurological scores showed that MCAO-subjected animals had greater neurological deficits compared to the control group at both 1 and 24 hours post-MCAO. In the frontal cortex, LPS+MCAO animals exhibited increased levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and decreased IL-10; in the hippocampus, TNF- α and IL-6 levels were elevated, while IL-10 was reduced. Regarding oxidative stress parameters, myeloperoxidase activity increased in the MCAO group in both structures and in the LPS+MCAO group in the frontal cortex compared to controls. Nitrate/nitrite levels were elevated in the frontal cortex of MCAO-subjected animals. Antioxidant defense analysis revealed decreased superoxide dismutase activity in the hippocampus of groups exposed to LPS and/or MCAO. Catalase activity was reduced in the frontal cortex of the MCAO and LPS groups, while in the hippocampus, enzymatic activity decreased in the MCAO groups but remained unaltered in the LPS-only group. Regarding lipid damage, (malondialdehyde) MDA levels were significantly elevated in MCAO-subjected animals. Finally, sulfhydryl content decreased only in MCAO-subjected groups. LPS attenuated nitrate/nitrite concentration and maintained CAT enzyme activity in the frontal cortex, as well as reduced MDA levels in the hippocampus of MCAO-subjected animals. These findings suggest that the MCAO model induces cognitive deficits, inflammation, and oxidative stress, which are hallmarks of the disease's pathophysiology. Childhood LPS exposure partially modulates biochemical alterations but does not prevent the impact of MCAO, indicating the need for further studies on trained immunity and exaggerated inflammation following insults.

Keywords: Endotoxin; cerebrovascular; development; immunity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sinalização do TLR-4 em AVCi após exposição ao LPS.	22
Figura 2: Desenho experimental demonstrando a metodologia aplicada para a realização da pesquisa	25
Figura 3: Gráfico com os resultados de geotaxia negativa dos animais expostos à SAL ou LPS	32
Figura 4: Gráfico com os resultados do peso dos animais expostos à SAL ou LPS do DPN 9 ao DPN 60	33
Figura 5: Gráfico com os resultados de escore de déficit neurológico de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	34
Figura 6: Gráficos com os resultados dos níveis de TNF- α no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	35
Figura 7: Gráficos com os resultados dos níveis de IL-1 β no córtex frontal e no hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	35
Figura 8: Gráficos com os resultados dos níveis de IL-6 no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	36
Figura 9: Gráficos com os resultados dos níveis de IL-10 no córtex frontal e hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	37
Figura 10: Gráficos demonstrando os resultados da atividade da enzima MPO no córtex frontal e no hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	38
Figura 11: Gráficos demonstrando os resultados da concentração de nitrito/nitrato no córtex frontal e no hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	38
Figura 12: Gráficos demonstrando os resultados da atividade da enzima SOD no córtex frontal e no hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	39
Figura 13: Gráficos demonstrando os resultados da atividade da enzima catalase no córtex frontal e no hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	40
Figura 14: Gráficos com os resultados da medida de MDA no córtex frontal e no hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	40
Figura 15: Gráficos demonstrando os resultados do conteúdo de sulfidrilas no córtex frontal e no hipocampo de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS	41

LISTA DE ABREVIATURAS ESIGLAS

AIT – Ataque isquêmico transitório

AVC – Acidente vascular cerebral

AVCh – Acidente vascular cerebral hemorrágico

AVCi – Acidente vascular cerebral isquêmico

BHE – Barreira hematoencefálica

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX – Ciclooxigenase

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos (do inglês: *damage-associated molecular Pattern*)

DPN – Dia pós-natal

DTNB – Ácido ditionitrobenzóico

EO – Estresse oxidativo

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

EUA – Estados Unidos da América

GPX – Glutationa peroxidase

HAS – Hemorragia subaracnóidea

HIC – Hemorragia intracerebral

IFN – Interferon

IFN- β – Interferon beta

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeo

MCAO – Oclusão de artéria cerebral média (do inglês: *middle cerebral artery occlusion*)

MDA – Malondialdeído

MMP – Metaloproteínas de matriz

MPO – Mieloperoxidase

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês: *nuclear factor kappa B*)

ON – Óxido nítrico

SH – Sulfidrilas

SHAM – Grupo controle da cirurgia (sem oclusão)

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *thiobarbituric acid reactive substances*)

TII – Trombectomia intracraniana intravascular

TNB – Ácido 5-tio-2- nitrobenzóico

TNF α – Fator de necrose tumoral alpha (do inglês: *tumor necrosis factor α*)

TRL – Receptores do tipo *Toll-Like* (do inglês: *toll-Like receptors*)

TT – Tióis totais

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	14
1.1.1.	Epidemiologia	15
1.1.2.	Etiologia do AVC isquêmico	16
1.1.3.	Fisiopatologia do AVC isquêmico	16
1.1.3.1	Estresse oxidativo	17
1.1.3.2	Neuroinflamação e inflamação periférica	18
1.1.4.	Tratamento	19
1.2.	MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA	20
1.2.1.	Mecanismos	21
1.2.2.	Lipopolissacarídeos	22
1.2.3.	Modulação imune e infância	23
2.	OBJETIVOS	24
2.1.	OBJETIVO GERAL	24
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	25
3.2.	ANIMAIS	25
3.3.	DESENHO EXPERIMENTAL	25
3.3.1.	Modulação imunológica na infância	26
3.3.2.	Modelo animal de AVCi por MCAO	26
3.4.	VERIFICAÇÃO DE PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO	27
3.4.1.	Avaliação do ganho de peso	27
3.4.2.	Teste geotaxia negativa	28
3.5.	AVALIAÇÃO DO ESCORE NEUROLÓGICO	28
3.6.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	28
3.6.1.	Ensaio imunoenzimáticos	28
3.6.2.	Análises dos parâmetros de estresse oxidativo	28
3.6.2.1	Atividade da enzima mieloperoxidase	29
3.6.2.2	Detecção de nitrato e nitrito	29
3.6.2.3	Atividade de superóxido dismutase (SOD)	29
3.6.2.4	Atividade da catalase (CAT)	29
3.6.2.5	Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	30
3.6.2.6	Avaliação de dano oxidativo aos lipídios	30
3.6.2.7	Medida de sulfidrilas totais	30
3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4.	RESULTADOS	32
4.1.	PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO	32
4.1.1.	Geotaxia negativa	32
4.1.2.	Acompanhamento do ganho de peso de animais expostos ao LPS	32
4.2.	DÉFICIT NEUROLÓGICO APÓS AVC EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LPS	33
4.3.	RESPOSTA INFLAMATÓRIA APÓS AVC EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LPS	34
4.4.	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO APÓS AVC EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LPS	37
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÃO	47

REFERÊNCIAS	48
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

De acordo com o Boletim da Organização Mundial de Saúde, o acidente vascular cerebral (AVC) é definido como uma doença de sinais clínicos súbitos causada por uma interrupção repentina do fluxo sanguíneo com duração superior a 24 horas, sendo que o comprometimento da função cerebral pode ser focal, global, ou até levar o paciente a morte (Aho *et al.*, 1980). Dentre os subtipos de AVC incluem-se o AVC isquêmico (AVCi), hemorrágico (AVCh) e também o ataque isquêmico transitório (AIT). Os dois primeiros subgrupos são definidos por conta de sua patologia, enquanto o AIT é um evento clínico com sinais relacionados à isquemia, que ocorre repentinamente e tem resolução completa em 24 horas, sem deixar nenhuma sequela (Lund, Dahl e Russel, 2007; Storey e Pols, 2009).

O AVC atinge a população desde os primórdios da sociedade, sendo que ainda nos anos anteriores a Cristo, com Hipócrates (460 a.C), já se estudava esta condição, mas na época era chamada de apoplexia (Clarke, 1963; Schutta, 2009). A hipótese de Hipócrates, era que a doença estaria ligada à teoria dos quatro humores (sangue, fleuma, bÍlis amarela e bÍlis negra) e se perpetuou por muitos anos (Clarke, 1963; Schutta, 2009). Somente no século XVII começou a ser investigada com novos olhos. Neste momento, a enfermidade foi reconhecida a primeira vez como AVC e foi comparada a um “golpe da mão de Deus”, o que significava que apresentava início repentino dos sintomas (Pound, Bury e Ebrahim, 1997; Schutta e Howe, 2006). No início do século XIX, John Abercrombie descobriu a ligação entre a doença arterial oclusiva e áreas de amolecimento cerebral, que eram causadas por infartos (Finger, Boller e Tyler, 2009) e somente no século XX, Rudolf Virchow fez uma nova classificação para as causas da apoplexia, sendo elas sanguínea (hemorrágica) e isquêmica, se tornando descobertas imprescindíveis para o que o AVC significa na atualidade (Finger, Boller e Tyler, 2009).

O AVCh acontece quando há o rompimento de um vaso sanguíneo e o sangue escoar para a cavidade intracraniana. O AVCh é classificado em dois subtipos, hemorragia intracerebral (HIC) (quando há o extravasamento do sangue de uma artéria do cérebro para o tecido cerebral) e hemorragia subaracnóidea (HAS) (quando há o sangramento arterial no espaço entre as meninges pia-máter e aracnoidea) (Sacco *et al.*, 2013). Já o ACVi ocorre quando há uma oclusão de um vaso sanguíneo, o que resulta em uma penumbra isquêmica,

área onde há hipóxia e privação de glicose por conta do baixo aporte sanguíneo (DeLong *et al.*, 2022).

As estratégias de tratamento do AVCi se baseiam na reperfusão para recuperar a área de penumbra, uma vez que a ausência de tratamento pode levar as células desta área à morte, o que faz que seja desenvolvido o núcleo isquêmico (DeLong *et al.*, 2022). Sendo assim, quanto mais rápido reestabelecer o fluxo sanguíneo, menor será a área isquemizada e menor será o comprometimento neurológico do paciente (Powers *et al.*, 2018).

1.1.1. Epidemiologia

O AVC ocupa a segunda posição no *ranking* das principais causas de morte no mundo e é uma das principais causadoras de incapacidade (George *et al.*, 2017; Katan e Luft, 2018), impondo grande encargo social e financeiro, visto que os pacientes por vezes necessitam de cuidados pré-hospitalares, hospitalares e pós-hospitalares (Luengo-Fernandez *et al.*, 2020; Rochmah *et al.*, 2021). Em relação aos gastos com o AVC, os Estados Unidos da América (EUA) empregou, de 2018 a 2019, aproximadamente 56,5 bilhões de dólares com atendimento, tratamento, cuidados pós-hospitalares, cuidados das incapacidades e também considerando as perdas produtivas por incapacidade ou morte prematura (Tsao *et al.*, 2023).

A prevalência de AVC no mundo entre 2017 e 2020 foi de 3,3%, sendo que 9,4 milhões de americanos apresentaram um quadro de AVC neste mesmo período (Tsao *et al.*, 2023). Destes, cerca de 87% foram AVCi e apenas 13% AVCh (10% HIC e 3% HAS) (Tsao *et al.*, 2023) e embora a prevalência seja menor, o AVCh apresentou letalidade maior (Katan e Luft, 2018). No Brasil, até o mês de novembro de 2023, 98.867 brasileiros morreram por conta do AVC (Miranda *et al.*, 2023). Sendo que, desde 2019, o AVC supera o número de mortes por infarto agudo do miocárdio no país, tendo uma relação inversa ao que acontece no restante do mundo ocidental (Miranda *et al.*, 2023). Desta forma, no Brasil, o AVC é a primeira causa de morte (Miranda *et al.*, 2023).

Segundo a última atualização de doenças cardíacas e AVC fornecida pela *American Heart Association*, em 2020, a cada três minutos alguém vai a óbito em decorrência do AVC (Tsao *et al.*, 2023). De acordo com dados acompanhados pela *Centers for Disease Control and Prevention*, americanos negros apresentam maior taxa de mortalidade por AVC do que as outras raças e etnias (Tsao *et al.*, 2023). Além disso, o AVC se mostra mais prevalente em mulheres ao comparar com os homens e com maior mortalidade em mulheres idosas comparando a homens da mesma idade (Kleindorfer *et al.*, 2010; Tsao *et al.*, 2023).

1.1.2. Etiologia do AVC isquêmico

O AVCi pode ser causado por mais de 100 patologias, sendo que possui três principais fatores causadores. A primeira é a doença de grandes vasos, onde estão o círculo de Willis e seus ramos proximais (artérias intracranianas), carótida comum, carótida interna e artérias vertebrais (artérias extracranianas). Nestas estruturas pode ocorrer a aterosclerose, dissecção arterial e embolia entre artérias, levando a oclusão por trombo ou êmbolo que causam a redução do fluxo sanguíneo para regiões específicas do cérebro (Chugh, 2019; Feske, 2021). A segunda é a doença de pequenos vasos, levando ao AVCi lacunar por conta de oclusão de vasos penetrantes e consequente isquemia de pequenas regiões no encéfalo (Yaghi *et al.*, 2021). Por fim tem-se o AVC por cardioembolismo, que ocorre quando o paciente apresenta alguma cardiopatia, como arritmia, doença cardíaca vascular, cardiomiopatia, entre outros, que produzem êmbolos de origem cardíaca que se deslocam até o cérebro e ocluem alguma das artérias (Chugh, 2019; Feske, 2021).

Existem alguns fatores de risco associados ao AVCi e costumam ser descritos como modificáveis e não modificáveis. Dentre os fatores modificáveis encontram-se hipertensão (Guo *et al.*, 2021), diabetes (Huang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021; Zheng e Yao, 2019), hiperlipidemia (Sun *et al.*, 2019), tabagismo (Peters, Huxley e Woodward, 2013) e sedentarismo (Feigin *et al.*, 2021; Ghozy *et al.*, 2022). Já os fatores de risco não modificáveis incluem as cardiopatias (Brachmann *et al.*, 2016; Sposato *et al.*, 2015) e o risco genético (Ekkert *et al.*, 2021).

1.1.3. Fisiopatologia do AVC isquêmico

Os fatores de risco podem levar ao AVC e afetar o cérebro por este ser um órgão extremamente sensível à redução do aporte sanguíneo e isso ocorre porque ele apresenta algumas particularidades (Kristián, 2004; Lee *et al.*, 2000). O cérebro possui a maior atividade metabólica por unidade de peso e não mantém reserva de carboidrato e por isso sofre consequências ao operar anaerobicamente (Kristián, 2004; Lee *et al.*, 2000). Também apresenta quantidade reduzida de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase e heme-oxigenase-1 e conta com níveis menores de citocromo C, o que favorece o escape de superóxido na cadeia transportadora de elétrons (Adibhatla e Hatcher, 2010; Damle *et al.*, 2009). Além disso, contém altos níveis de ácidos

graxos poli-insaturados nas membranas celulares, o que torna o cérebro mais propenso a danos oxidativos (Adibhatla e Hatcher, 2010).

O processo de isquemia e reperfusão cerebral induz a liberação neuronal excessiva de glutamato e dopamina, o que gera uma sobrecarga de cálcio e conseqüentemente leva a citotoxicidade (Choi e Rothman, 1990; Lee *et al.*, 2000; Pallast *et al.*, 2009). Com a redução do suprimento sanguíneo, o metabolismo passa a ser anaeróbico, o que diminui o pH celular e interfere no processo de fosforilação oxidativa. Isto compromete o metabolismo energético e diminui a produção de ATP, que é esgotado rapidamente e então as ATPases (como a Na⁺/K⁺ ATPase e Na⁺/Ca²⁺ ATPases) não conseguem exercer sua função, sobrecarregando o meio intracelular de sódio e cálcio (Sekerdag, Solaroglu e Gursoy-Ozdemir, 2018).

O excesso de cálcio leva ao inchaço das organelas, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, que são lesionados e rompidas (Shi *et al.*, 2021), quando o citocromo C, um ativador apoptótico, é liberado das mitocôndrias para promover a apoptose (Sekerdag, Solaroglu e Gursoy-Ozdemir, 2018). Este processo gera altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), disfunção mitocondrial e sinalizam a lesão para células inflamatórias que liberam citocinas pró-inflamatórias e exacerbam a morte celular local (Anrather e Iadecola, 2016; Huang, Upadhyay e Tamargo, 2006; Yilmaz e Granger, 2010). Este conjunto de fenômenos levam danos na barreira hematoencefálica (BHE), estresse oxidativo (EO), apoptose, inflamação e desequilíbrio iônico, causando danos neuronais (Kalogeris *et al.*, 2016).

1.1.3.1. Estresse oxidativo

Foi demonstrado que o EO, fenômeno causado quando há um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, exacerba a disfunção e a morte neuronal, piorando os déficits funcionais (Allen e Bayraktutan, 2009; Beal, 2000; Hu *et al.*, 2019; Manzanero, Santro e Arumugam, 2013). Quando ocorre um AVCi, há um pico de produção de ERO e ERN, sendo estas responsáveis por danificar ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos, além de levar a apoptose ou necrose celular acelerada (Olmez e Ozyurt, 2012).

O processo de isquemia afeta as mitocôndrias e o metabolismo, sendo que a primeira ERO a ser produzida é o ânion superóxido (O₂⁻) (Granger e Kvietys, 2015), que *per se* não é tóxico *in vivo*, pois sofre uma reação química de dismutação rápida e espontânea em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mas que quando esta reação é apoiada pela SOD, ocorre cerca de dez mil vezes mais rápido. Em contrapartida, o H₂O₂ pode ser altamente citotóxico se produzido

em grandes quantidades, além de poder gerar, através da reação de Fenton, o radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) que é extremamente reativo e lesivo (Kalogeris *et al.*, 2016).

As células fagocíticas, recrutadas para o tecido lesionado quando ocorre um AVC, utilizam a NADPH oxidase para gerar O_2^- que com a ação da SOD leva a formação de H_2O_2 e este pode, assim como na disfunção mitocondrial, levar a formação de $\text{HO}\cdot$ e também servir como substrato para formar ácido hipocloroso com a catálise realizada pela mieloperoxidase (MPO) (Kalogeris *et al.*, 2016). Além disso, o O_2^- também pode interagir com o óxido nítrico (ON), uma ERN gerada pela citocromo C oxidase mitocondrial quando a célula está em estado hipóxico (Castello *et al.*, 2006), formando o peroxinitrito, sendo o precursor de ácido peroxinitroso ou $\text{HO}\cdot$ (Kalogeris *et al.*, 2016).

Neste contexto, diversos estudos pré-clínicos têm demonstrado que a terapia com estratégias antioxidantes pode atenuar a isquemia cerebral, diminuindo o tamanho de infarto e melhorando a recuperação neurológica de animais expostos à modelos experimentais (Ikeda *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 1994; Yoshioka *et al.*, 2011). Além disso, já existem algumas pesquisas clínicas investigando os efeitos da terapia antioxidante em pacientes com AVCi, como o estudo de Müllges e colaboradores (2003), que mostrou que a administração de edaravone, um eliminador de radicais livres como peroxil, hidroxila e superóxido, exerce efeitos benéficos com melhorias clínicas (Grotta, 1997; Nakase *et al.*, 2011).

1.1.3.2 Neuroinflamação e inflamação periférica

Associado ao EO, acontece a inflamação induzida pela isquemia, sendo um fator adicional que leva a mais danos neuronais após o AVCi (Ren *et al.*, 2020). A inflamação gerada pelo AVCi é denominada estéril. No entanto a resposta inflamatória contra a isquemia é semelhante àquelas provocadas por patógenos. Em ambos os casos, ocorre o recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local do tecido lesionado, além de haver a ativação da micróglia e perpetuação da produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (Gelderblom *et al.*, 2009; Ioannou, Lucca e Tsokos, 2011). Isso ocorre devido a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) pelas células mortas ou que estão morrendo devido a isquemia (DeLong *et al.*, 2022). Estes DAMPs são detectados por receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores *toll-like* (TLRs), que ativam fatores de transcrição e reguladores do interferon (IFN) através de proteínas adaptadoras, como a diferenciadora mieloide 88 (MyD88) e o adaptador contendo domínio Toll/IL-1R

induzindo IFN- β (TRIF), e estes promovem a regulação de proteínas envolvidas na resposta imune inata (Liesz *et al.*, 2015; McDonald *et al.*, 2010).

A ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (nuclear factor kappa B - NF- κ B) modula a formação de moléculas inflamatórias e citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF) α , interleucina (IL) 6, IL-1 β e ciclooxigenase (COX) 2, que também ativam a micróglia e está produz citocinas e quimiocinas adicionais (Harari e Liao, 2010). Este conjunto de fatores contribui para a quebra da BHE, que favorece o aumento da permeabilidade vascular, possibilitando que ainda mais neutrófilos ativados sejam recrutados para o cérebro e ativem a metaloproteinase de matriz (MMP) 9 que agride diretamente a BHE (Gidday *et al.*, 2005; Rosell *et al.*, 2006, 2008).

Um fato curioso descoberto, é que se existir a supressão da atividade do NF- κ B após um AVCi, isso reduz os danos causados pela inflamação, já que diminuiria as citocinas e o recrutamento de mais células inflamatórias (Nijboer *et al.*, 2008). Além disso, é importante destacar que após o AVCi os níveis de citocinas e quimiocinas se alteram não apenas no cérebro, mas também na periferia (Offner *et al.*, 2006), sugerindo que existe uma íntima relação entre as respostas inflamatórias do cérebro e no sangue periférico (Vartanian *et al.*, 2011). Corroborando com esta ideia, existe uma incidência de aproximadamente 30% dos pacientes após AVC que apresentarem infecções do trato urinário e pneumonia principalmente, enfatizando a relação entre o AVCi e a periferia (Gong *et al.*, 2016; Westendorp *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2017).

Decorrendo ao EO e a inflamação instalada com o passar dos minutos após o AVC, as células neuronais sobrevivem por um curto período de isquemia, sendo que algumas delas podem resistir mais tempo que outras, o que é chamado de lesão reversível. Conforme o tempo passa mais células morrem, estendendo a lesão e causando danos irreversíveis ao tecido (Hankey, 2017). Desta forma, é importante entender que para haver a recuperação neurológica completa ou com o melhor prognóstico, o AVCi deve ser tratado o mais rápido possível uma vez que a cada minuto a lesão amplia e se instala completamente, enfatizando o conceito “tempo é cérebro” (Hankey, 2017).

1.1.4. Tratamento

Os tratamentos para o AVCh envolvem a remoção de coágulos de sangue intracranianos ou intraventricular por meio de cirurgia invasiva e também o controle da pressão intracraniana para reduzir efetivamente a mortalidade (Powers *et al.*, 2019; Tsao *et*

al., 2023). Já os tratamentos direcionados para o AVCi, buscam alcançar a reperfusão rápida com a trombólise intravenosa e/ou trombectomia intracraniana intravascular (TII), lembrando que ambos os meios possuem uma janela de efetividade estreita (Jovin *et al.*, 2015; Paolucci *et al.*, 2003).

A classe de medicamentos trombolíticos por serem ativadores de plasminogênio tecidual, como o alteplase, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* em 1996 e é a única até o momento a demonstrar resultados positivos quando administrado nos estágios iniciais do AVCi (até 4,5 horas após o início dos sintomas) (Bluhmki *et al.*, 2009; Hacke *et al.*, 2004; Jovin *et al.*, 2015; Lansberg *et al.*, 2012; Powers *et al.*, 2018). Além disso, também é possível tratar o AVCi cirurgicamente, utilizando a TII, que pode ser realizada em um espaço de tempo maior do que o tratamento químico (Jovin *et al.*, 2015). Alguns estudos mostram que a TII realizada até seis horas após o início dos sintomas é benéfica e outros mostram que este procedimento pode ser realizado até 24 horas após (Campbell *et al.*, 2015; Goyal *et al.*, 2015; Jovin *et al.*, 2015), mostrando algumas inconsistências quanto ao tempo de realização. Porém, é importante destacar que este método também pode ser limitado devido a posição onde ocorreu a oclusão (Shobha, Buchan e Hill, 2011).

Após o tratamento do AVC, é importante que o paciente seja direcionado para programas de reabilitação e indicado que o estilo de vida seja modificado a longo prazo, em uma tentativa de alcançar a recuperação clínica máxima (Hankey, 2017). Além disso, tão importante quanto o tratamento é a prevenção do primeiro AVC ou do AVC recorrente, uma vez que 85% de todos os AVCs são evitáveis (O'Donnell *et al.*, 2010; Sarikaya, Ferro e Arnold, 2015). Desta forma, pesquisadores estão investigando o papel da modulação imunológica, a fim de diminuir os danos causados por este fenômeno em diversas doenças, como sepse (Florentino *et al.*, 2020; Saia *et al.*, 2011), alergias (Ding *et al.*, 2020), asma (Xing *et al.*, 2024) doenças neurodegenerativas (Wendeln *et al.*, 2018) e doenças cerebrovasculares (Bastide *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 1999; Wendeln *et al.*, 2018),

1.2. MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA

As respostas imunes do hospedeiro são classicamente divididas em respostas imunes inatas, que reagem de forma rápida e não específica assim que um patógeno é encontrado, e respostas imunes adaptativas, que são específicas para seus antígenos, mais lentas para se desenvolver e geram a memória imunológica clássica (Netea *et al.*, 2016). Porém, esta distinção foi desafiada ao ser descoberto os receptores de reconhecimento de padrões

(Medzhitov e Janeway, 2000) e que o sistema imune inato pode adaptar suas reações decorrente ao encontro com insultos antecedentes (Bowdish *et al.*, 2007; Netea, Quintin e van der Meer, 2011).

O sistema imune inato, pode exercer proteção cruzada entre diferentes tipos de insultos ao longo de alguns meses (Benn *et al.*, 2013; Kleinnijenhuis *et al.*, 2012, 2014; Quintin *et al.*, 2014), sendo chamado esse fenômeno de “imunidade treinada” (López-Collazo e del Fresno, 2024). Em contrapartida, quando há exposição repetida a um mesmo estímulo, há a tolerância, como por exemplo a “tolerância à endotoxina” (lipopolissacarídeo – LPS) (Biswas e Lopez-Collazo, 2009).

1.2.1. Mecanismos

Ambos os fenômenos, tolerância à endotoxina e imunidade treinada, parecem utilizar mecanismos semelhantes (López-Collazo e del Fresno, 2024) e uma forma eficaz de induzir a modulação imune na isquemia cerebral acontece por meio da ativação da resposta imune inata com ligantes para TLR. Foi demonstrado que administração sistêmica prévia de agonista, como LPS ou oligonucleotídeos CpG, de TLR, que são expressos em células cerebrais e sistêmicas, reduz o tamanho de infarto e protege o cérebro de camundongos e primatas não humanos de modelos de isquemia cerebral (Bahjat *et al.*, 2011; Hua *et al.*, 2008; Marsh *et al.*, 2009; Rosenzweig *et al.*, 2004, 2007; Stevens *et al.*, 2008; Tasaki *et al.*, 1997).

Quando o TLR é sinalizado, induz a ativação do NF- κ B, que por sua vez leva à resposta inflamatória. Em contrapartida, a sinalização do TLR pode ativar o IRF (fator regulador de interferon (IFN)) e estes podem induzir mediadores anti-inflamatórios e IFN tipo I, que vem sendo associado à neuroproteção (Marsh *et al.*, 2009; Stevens *et al.*, 2011). Estudos recentes sugerem que a neuroproteção induzida por TLR sucede a reprogramação da resposta genômica aos DAMPs. Desta forma, em um segundo estímulo, a resposta reprogramada pode expressar preferencialmente as proteínas mediadas por TRIF e IRF-3 e suprime a atividade do NF- κ B (Marsh *et al.*, 2009; Stevens *et al.*, 2011; Vartanian *et al.*, 2011). De modo interessante, animais deficientes em IRF-3, mesmo recebendo o LPS, não ficam protegidos contra a isquemia cerebral, sugerindo o importante papel modulador do IRF-3 após a administração de LPS (Marsh *et al.*, 2009). A figura 1 exemplifica as diferenças na sinalização do TLR-4 após estímulo por DAMPs em AVCi sem e com exposição ao LPS.

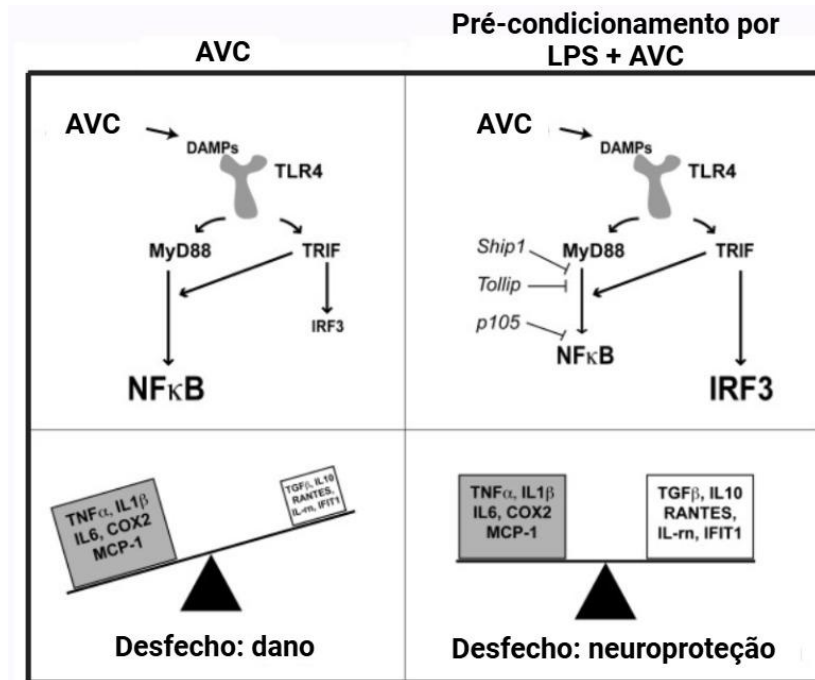


Figura 1 - Sinalização do TLR-4 em AVCi após exposição ao LPS. A esquerda, a ativação do TLR-4 após AVCi, onde a via de sinalização do NF-κB é mais acentuada do que a via do IRF-3, transcrevendo mais proteínas inflamatórias e consequentemente gerando dano exacerbado. Na direita, após a modulação imunológica, a via do NF-κB é suprimida e a do IRF-3 é preferencialmente ativada, não havendo excesso de proteínas inflamatórias, mas sim um equilíbrio entre proteínas inflamatórias e anti-inflamatórias e consequente neuroproteção. Fonte: Vartanian et al. (2011).

Até o momento, o mecanismo de diferenciação na ativação do TLR-4 entre fenótipo de tolerância à endotoxina ou imunidade treinada após o segundo insulto ainda é desconhecido, trazendo à tona um papel de ambiguidade para o TLR4, com efeito variado dependendo da estimulação secundária (López-Collazo e del Fresno, 2024).

1.2.2. Lipopolissacarídeos

O LPS é um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas e é um promotor importante de inflamação sistêmica (Smeding *et al.*, 2013). A molécula clássica de LPS possui três subunidades, (i) lipídio A, (ii) oligossacarídeo e (iii) polissacarídeo com antígeno O (Whitfield e Trent, 2014), sendo que a porção lipídica é considerada a responsável pela maior ação antigênica do LPS (Galanos et al., 1985; Molinaro et al., 2015). A estrutura do LPS é liberada após a bactéria se multiplicar ou ser fagocitada e degradada pelas células de defesa, estando livre para se ligar a receptores e exercer seu papel (Li *et al.*, 2014).

Na modulação imunológica, a primeira exposição ao LPS com baixas doses, induz reprogramação da resposta. O primeiro insulto é caracterizado por níveis aumentados de proteínas pró-inflamatórias e baixos níveis de proteínas anti-inflamatórias, mas quando ocorre

uma segunda exposição, como dose maior, o inverso acontece (Broad, Kirby e Jones, 2007; Fan e Cook, 2004; Liew *et al.*, 2005; West e Heagy, 2002). Além disso, é um potente ligante de TLR-4 e vários estudos vem demonstrando que os animais expostos a este componente na idade adulta, se tornam tolerantes à isquemia cerebral (Hickey *et al.*, 2007; Rosenzweig *et al.*, 2004; Tasaki *et al.*, 1997), mas pouco se sabe o que acontece quando a exposição ocorre nos primeiros anos de vida.

1.2.3. Modulação imune e infância

A infância é um período crítico do desenvolvimento, onde o sistema imunológico inato ainda apresenta imaturidade, mas apesar disso, as células de defesa possuem maior plasticidade, onde estímulos alérgenos e patógenos podem programar respostas imunológicas até a idade adulta (Saia *et al.*, 2011). Assim, crianças que viveram em ambientes agrícolas e dispuseram de contato físico com animais apresentam menos sensibilização a alérgenos comuns na vida adulta, como asma e rinite (Björkstén *et al.*, 1999; Bjorksten *et al.*, 1998; Gerrard *et al.*, 1976; Irnell e Kiviloog, 1968; Mutius, von e Radon, 2008; Naleway, 2004; Radon, Schulze e Nowak, 2006; Seiskari *et al.*, 2007; Strachan, 2000). Estes estudos comprovam a teoria da higiene/teoria dos velhos amigos, que narra sobre importância da exposição a germes na infância para programar o sistema imunológico para não reagir exageradamente na idade adulta e gerar doenças (Strachan, 2000).

Anteriormente, foi verificado que a febre de ratos adultos foi suprimida naqueles que receberam LPS quando estavam com apenas 14 dias de idade, além de apresentarem redução nos níveis de IL-6, TNF- α e ciclooxygenase (Boissé *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2006) e aumento na liberação da interleucina anti-inflamatória IL-10 (Wang, Wang e Sheibani, 2006). Dois estudos anteriores, de Saia *et al.* (2011) e Florentino e colaboradores (2020), observaram que após a exposição ao LPS no período da infância, aos 14 dias de idade, o desfecho da sepse polimicrobiana pôde ser atenuado, inclusive oferecendo neuroproteção. Por fim, um estudo comparando o melhor período para a modulação imunológica, induzida LPS, mostrou que é mais eficaz em ratos jovens do que em ratos adultos (Sun *et al.*, 2012).

Desta forma, denota-se necessário a investigação dos efeitos da modulação imunológica induzido por LPS durante o período da infância no desfecho do AVCi ocorrido na idade adulta de ratos machos *Wistar*. Assim, ajudará a compreender a fisiopatologia do AVCi e formar estratégias de tratamentos futuros.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da modulação imunológica induzida por LPS no período da infância em um modelo animal de AVCi na idade adulta.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o peso da prole no 9º, 12º, 14º, 15º, 16º, 17º, 25º, 42º e 60º dia pós-natal (DPN), bem como o teste de geotaxia negativa no 15º DPN, como indicadores de desenvolvimento e crescimento em ratos machos submetidos à modulação imunológica com LPS;
- Avaliar o efeito da modulação imunológica com LPS durante a infância sobre o escore neurológico em ratos *Wistar* machos após modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) aos 60 dias de vida;
- Avaliar o efeito da modulação imunológica com LPS durante a infância sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α , IL1- β , IL-6 e IL-10), no córtex frontal e hipocampo de ratos *Wistar* machos após modelo de MCAO aos 60 dias de vida;
- Avaliar o efeito da modulação imunológica com LPS durante a infância sobre o dano oxidativo e defesa antioxidante enzimática no córtex frontal e hipocampo de ratos *Wistar* machos após modelo de MCAO aos 60 dias de vida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 50/2023 (Anexo A). Os animais foram procedentes do Biotério Central da UNESC e todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante o experimento.

3.2. ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos *Wistar* machos, que ficaram acondicionados com as mães até o desmame, no 21º dia pós-natal (DPN). Após isso, os animais foram acondicionados em gaiolas (comprimento 41 cm x largura 34 cm x altura 17 cm) com quatro animais cada, sob ciclo de claro e escuro de 12 horas (6:00 às 18:00), com livre acesso ao alimento padrão para roedores da NuVilab (NUVITAL) e água do sistema público de fornecimento que foi filtrada, colocado em bebedouros para os animais em gaiolas de tamanho padrão do biotério. O ambiente foi mantido à temperatura constante e diária de 22 ± 1 °C e umidade de aproximadamente 55%. A maravalha que forra as caixas dos animais foi trocada a cada dois dias e a sala apresentava o sistema de exaustor, de modo a mantê-los com o máximo de conforto possível.

3.3. DESENHO EXPERIMENTAL

A metodologia aplicada para a realização desta pesquisa, está ilustrada na figura 2.

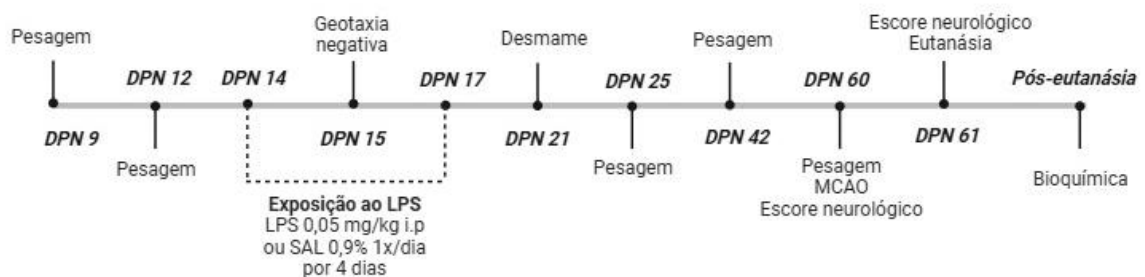


Figura 2 – Desenho experimental. Fonte: A autora (2024).

3.3.1. Modulação imunológica na infância

A modulação imunológica na idade equivalente à infância para os roedores, foi realizado do 14º ao 17º DPN. A modulação imunológica foi induzida por administração de LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em uma concentração de 50 µg/Kg, via intraperitoneal (i.p.), uma vez ao dia, por um período de quatro dias (Wendeln *et al.*, 2018).

Os animais foram inicialmente divididos em dois grupos cada, tratados com salina 0,9 % ou LPS 50 µg/Kg. Após, todos os animais foram deixados envelhecer até o 60º DPN, quando foram submetidos ao modelo animal de AVCi por MCAO.

Desta forma, um total de 54 animais, divididos em quatro grupos, foram utilizados para realizar o presente projeto, conforme tabela 1:

Tabela 1 – Grupos experimentais.

Grupo	Pré-tratamento	Tratamento	n
SAL+SHAM	Salina	SHAM	14
SAL+MCAO	Salina	MCAO	11
LPS+SHAM	LPS	SHAM	13
LPS+MCAO	LPS	MCAO	16

n = número de animais por grupo; LPS = lipopolissacarídeo; SHAM = grupo controle da cirurgia (sem oclusão); MCAO = oclusão da artéria cerebral média.

3.3.2. Modelo animal de AVCi por MCAO

Conforme descrito por Bederson e colaboradores (1986), os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália, Brasil) (1L/min de O₂ e 1L/min O₂ ambiente) e mantidos sob anestesia utilizando o fluxo de 1 – 2% de isoflurano com vaporizador de kit de anestesia (Hipnos 50 l, Previtich, Brasil). Após a anestesia total, foi realizada tricotomia na região cervical ventral e em seguida assepsia com clorexidina a 4%. A incisão foi no local asséptico no pescoço na linha média ventral. Para a realização da MCAO unilateral foi inserido um monofilamento revestido com borracha de silicone (Docol Corporation – diâmetro 0.185 mm e comprimento de 30 mm) na artéria carótida interna direita a 6 mm da bifurcação da artéria carótida interna através de um coto da artéria carótida externa. Em seguida, fechou-se o plano cirúrgico com fio de sutura nylon 3-0 (Shalom, Brasil) e a isquemia cerebral teve duração de 60 minutos. Os animais do grupo controle da cirurgia (SHAM) foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto pela oclusão da artéria carótida

interna. Após 60 minutos de MCAO, sob anestesia, a oclusão foi removida para permitir a reperfusão. A temperatura foi monitorada e mantida a aproximadamente 37 °C durante a cirurgia e isquemia usando um colchão térmico.

Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. Logo após o procedimento MCAO, foi administrado duas vezes dipirona 80 mg/Kg por via subcutâneo a cada 12 horas para manter os animais sem sofrimento. Durante o período de três horas após o início da reperfusão, os animais foram mantidos em temperatura interna de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para evitar hipotermia cerebral induzida por isquemia. Em seguida, eles retornaram às suas gaiolas com livre acesso a água e comida e foram monitorados a cada quatro horas para verificação de hemorragia, hipertermia ou dor. Após uma e 24 horas de reperfusão do protocolo de MCAO, os animais foram submetidos a uma série de testes para avaliação do escore neurológico.

3.4. VERIFICAÇÃO DE PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO

Ainda durante a vida dos animais, foram avaliados alguns parâmetros para verificar o desenvolvimento geral antes e depois da administração de LPS.

3.4.1. Avaliação do ganho de peso

Antes do desmame, nos DPN 9, 12, 14, 15, 16 e 17 foi registrado o peso dos animais. Para a realização desse parâmetro, a matriz foi retirada da caixa dos animais ainda filhotes e foi colocada em uma caixa limpa. Antes da pesagem, um recipiente de pesagem foi preparado com uma pequena quantidade de maravalha do ninho. A pesagem foi realizada com uma ninhada de cada vez, dividindo o peso pela quantidade de filhotes de cada ninhada. Após o desmame no DPN 21, os animais foram pesados de forma individual nos DPN 25, 42 e 60. Após cada procedimento, todos os animais foram recolocados na caixa original e devolvidos ao biotério. O recipiente de pesagem foi higienizado com álcool 70%, seguido de álcool 10%, assim como a luva do pesquisador foi trocada para não haver risco de transferir odor de uma ninhada para outra e a matriz abandonar ou matar os filhotes (Costa *et al.*, 2024).

3.4.2. Teste geotaxia negativa

No 15° DPN os animais foram colocados um por vez em uma rampa com 45 graus de inclinação, com a cabeça direcionada para baixo, conforme descrito por Alberts *et al.* (2004). Foi registrado o tempo que cada animal levou para girar 180 graus em seu próprio eixo, ou seja, com a cabeça voltada para cima. O limite de tempo para cada animal foi de 1 minuto, sendo que cada animal teve direito a três tentativas para completar a tarefa.

3.5. AVALIAÇÃO DO ESCORE NEUROLÓGICO

Após uma hora e 24 horas da indução de MCAO, foi avaliado o escore neurológico a fim de averiguar o comprometimento neurológico. Este parâmetro é baseado em uma escala de déficit neurológico onde foram verificados alguns comportamentos a partir de testes motores, testes sensoriais, testes de equilíbrio e testes de reflexo (Bederson *et al.*, 1986b; Ryck, De *et al.*, 1989).

Logo após a última verificação do escore neurológico, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e então o hipocampo e córtex frontal foram isolados e armazenadas em freezer a -80 °C para análises bioquímicas posteriores.

3.6. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1. Ensaio imunoenzimático

As amostras foram processadas e após, uma placa de 96 poços foi sensibilizada para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) foi utilizado o método *enzyme-linked immuno absorbent assay* (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA).

3.6.2. Análises dos parâmetros de estresse oxidativo

Todas as mensurações dos parâmetros de estresse oxidativo foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, que foram determinadas pelo método adaptado inicialmente descrito por (Lowry *et al.*, 1951), baseado na reação de Folin-Ciocalteu. A leitura das mensurações de proteínas foi realizada em leitor de microplacas por absorvância, expressas como mg de proteína.

3.6.2.1. Atividade da enzima mieloperoxidase

O indicativo de infiltrado de neutrófilos e produção de EROs pode ser avaliado por meio da atividade da MPO (Amanzada *et al.*, 2011). Os tecidos obtidos foram homogeneizados (50 mg/mL) em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma-Aldrich, EUA) e centrifugado a 15.000 g durante 40 minutos. Uma parte do sobrenadante foi misturada com solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM (Sigm-Aldrich, EUA) e 1 mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A atividade foi medida como a variação de absorbância a 650 nm a 37 °C (Young *et al.*, 1989). Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína.

3.6.2.2. Detecção de nitrito e nitrato

Uma solução padrão de nitrato de sódio (100 mL) foi diluída seriadamente (200 µM à 1,6 mM) em duplicata, em placa de 96 poços. Após o preparo da curva, 100 µL das amostras homogeneizadas foram pipetadas em cada poço; em seguida, 100 µL solução de cloreto de vanádio foram adicionados aos poços, rapidamente seguido da adição de reativo de Griess (50 µL de SULF + 50 µL de NEED). Após trinta minutos foi realizada a leitura em 540 nm (Kvietys e Granger, 2012).

3.6.2.3. Atividade de superóxido dismutase (SOD)

Primeiramente foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Foram adicionados à amostra catalase 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente a 480 nm a temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína (Bannister e Calabrese, 1987).

3.6.2.4. Atividade da catalase (CAT)

A atividade enzimática da CAT foi determinada pela diminuição no consumo de peróxido de hidrogênio. As amostras teciduais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão catalase PBS+NaCl (pH 7,0), contendo 8,0086 g de NaCl (136,9 mM), 0,1496 g de KH₂PO₄ (1,1 mM) e 0,0383 g de Na₂HPO₄ (0,27 mM)] e centrifugadas por 10 min em 3000 rpm, em temperatura ambiente. O reagente branco foi preparado a partir da mistura de 100 µL de

sobrenadante da amostra com um mL de tampão catalase e foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. O reagente amostra foi preparado a partir da mistura de 100 µL de sobrenadante da amostra com um mL de tampão catalase contendo H₂O₂ (25 mL de tampão catalase e 400 µL de H₂O₂, protegido da luz). A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro de lâmpada de deutério, em cubetas de quartzo, a 240 nm. Foram realizadas mensurações referentes ao decaimento de absorbância nos tempos zero, 30 e 60 segundos. O processo foi repetido para cada amostra. A atividade da CAT foi expressa em U de CAT/mg de proteína (Aebi, 1984).

3.6.2.5. Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como índice de peroxidação lipídica foi medido a quantidade de TBARS durante uma reação ácida aquecida. As amostras foram diluídas em tampão PBS e um ml de ácido tricloroacético 10% foi adicionado. Após centrifugação, foi adicionado um ml de ácido tiobarbitúrico ao sobrenadante e a mistura final aquecida em banho-maria (100 °C) por 30 minutos. Após este período a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA)/mg de proteína (Draper e Hadley, 1990).

3.6.2.6. Avaliação de dano oxidativo as proteínas

O índice de dano oxidativo às proteínas foi quantificado pela reação dos grupamentos carbonilados com dinitrofenilhidrazina (Levine *et al.*, 1990). As 28 proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético 20% (Vetec) e redissolvidas em dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich, EUA). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.6.2.7. Medida de sulfidrilas totais

Este método determina quantidade de sulfidrilas (SH) não oxidadas, que estão presentes nos aminoácidos. Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de (Aksenov e Markesbery, 2001). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis

não oxidados, gerando um derivado amarelo, o ácido 5-tio-2- nitrobenzóico (TNB), lido a 412 nm em espectrofotômetro. Com isso, o método determina os tióis totais (TT) da amostra.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, foram empregados o teste de Shapiro-Wilk para analisar a normalidade e o teste de Levene para a homogeneidade. Se os dados apresentaram distribuição normal e a homogeneidade de variância for confirmada, foram utilizados testes paramétricos; se os dados não cumpriram estas condições, foram utilizados os testes não paramétricos. Para as análises do teste de geotaxia negativa foi utilizado teste T, já para o peso e as bioquímicas, ANOVA de duas ou três vias conforme indicação, seguido de teste *post hoc* de Tukey. Os dados foram apresentados como média \pm DPM. Os valores foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$, com símbolo de asterisco (*) quando houve diferença entres os grupos, guiados por colchetes. Todas as análises foram executadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 9.0.0.

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO

Para verificar se a exposição ao LPS na dosagem de 50 µg/Kg e administrado no período correspondente à infância de ratos pode afetar o crescimento e desenvolvimento dos animais, foi realizado o teste de geotaxia negativa que avalia o neurodesenvolvimento e também foi acompanhado o ganho de peso.

4.1.1. Geotaxia negativa

Conforme apresentado na figura 3, os animais expostos ao LPS, precisaram de menos tempo para girar 180° no aparato ($t = 2,510$; $df = 42$; $p = 0,0160$), quando comparados ao grupo controle.

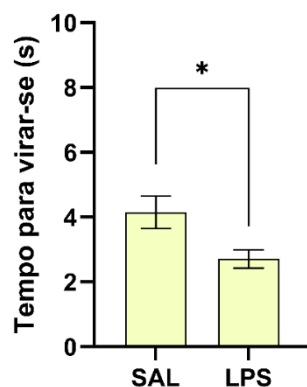


Figura 3: Geotaxia negativa dos animais expostos à SAL ou LPS. Tempo que os animais levaram para virar o corpo 180°, no próprio eixo, expresso em segundos. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 22$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando Teste T. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

4.1.2. Acompanhamento do ganho de peso de animais expostos ao LPS

Em relação ao ganho de peso, ilustrado na figura 4, que foi realizado entre o DPN 9 e 60, foi observado que até o DPN 17 não houve alteração no ganho de peso. Em contrapartida, nas verificações do peso após o final do tratamento, nos DPN 25, 42 e 60, o grupo LPS apresentou peso menor ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle.

Neste resultado, foi observado que houve interação entre os efeitos exercidos pelos dois fatores, dia da pesagem e exposição ao LPS no período da infância ($F_{(8, 59)} = 27,33$; $p = 0,0001$).

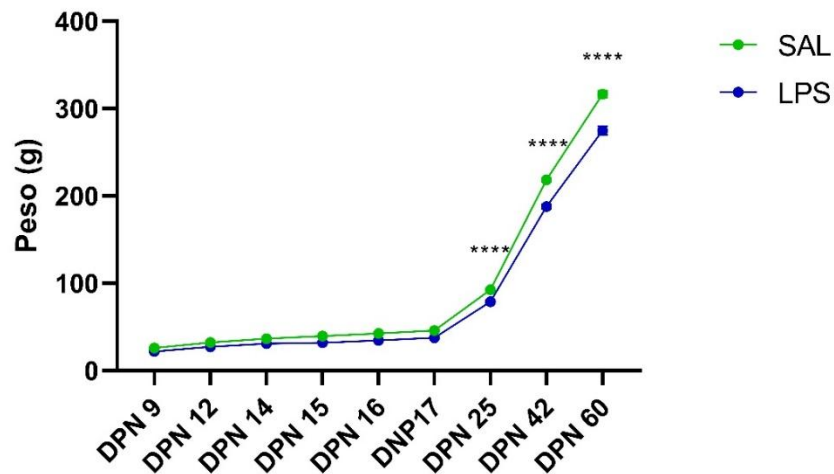


Figura 4: Peso dos animais expostos à SAL ou LPS. Peso, em gramas, dos animais que foram expostos à SAL ou LPS do DPN 9 ao DPN 60. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média (n = 22 animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de post hoc de Tukey. ****p < 0,0001 comparado ao grupo controle.

4.2. DÉFICIT NEUROLÓGICO APÓS AVC EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LPS

A figura 5 mostra o escore de déficit neurológico, realizado após uma hora e 24 horas do MCAO. Nos dados obtidos na análise após uma hora, os animais dos grupos SAL+MCAO ($p < 0,0001$) e LPS+MCAO ($p = 0,0001$) apresentaram escores maiores em comparação ao grupo controle. De forma semelhante, quando comparados ao grupo LPS+SHAM, os mesmos grupos, SAL+MCAO ($p = 0,0025$) e LPS+MCAO ($p = 0,0002$), mostraram escores menores. Corroborando com esses dados, após 24 horas do MCAO, os grupos SAL+MCAO ($p < 0,0001$) e LPS+MCAO ($p < 0,0049$) permaneceram aumentados em relação ao grupo controle.

Nas análises de efeito, foi observado efeito principal exercido pelo tempo após o MCAO que foi verificado o escore (uma hora e 24 horas) ($F_{(1, 58)} = 7,087$; $p < 0,0091$) e pelo modelo ($F_{(1, 99)} = 76,67$; $p < 0,0001$). Além disso, houve uma interação entre a exposição ao LPS e o modelo utilizado ($F_{(1, 58)} = 4,887$; $p < 0,0294$).

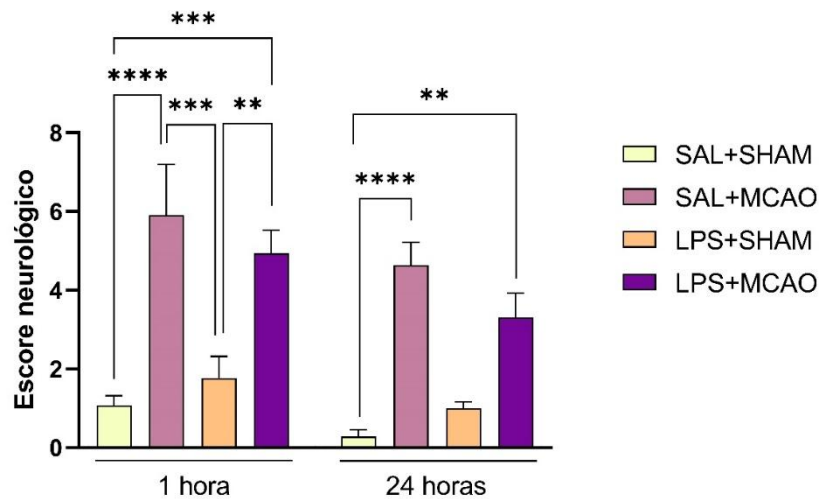


Figura 5: Escore de déficit neurológico de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 11-16$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de post hoc de Tukey. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para comparações entre grupos.

4.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA APÓS AVC EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LPS

Como forma de avaliar a resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória frente à exposição ao LPS e MCAO, foram realizadas técnicas imunoenzimáticas para verificar os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 nas regiões do córtex frontal e hipocampo.

Na análise da quantidade de TNF- α , foi identificado que no córtex frontal (figura 6A), os grupos SHAM+MCAO ($p < 0,0018$), LPS+SHAM ($p < 0,0002$) e LPS+MCAO ($p < 0,0026$) apresentaram quantidades elevadas de TNF- α , quando comparados ao grupo controle. Já na região do hipocampo (figura 6B), houve aumento dos níveis de TNF- α apenas nos grupos SAL+MCAO ($p < 0,0008$) e LPS+MCAO ($p < 0,0161$). Em relação à interação de fatores, houve interação entre a exposição ao LPS e o modelo estudado ($F_{(1, 12)} = 10,51$; $p < 0,0071$).

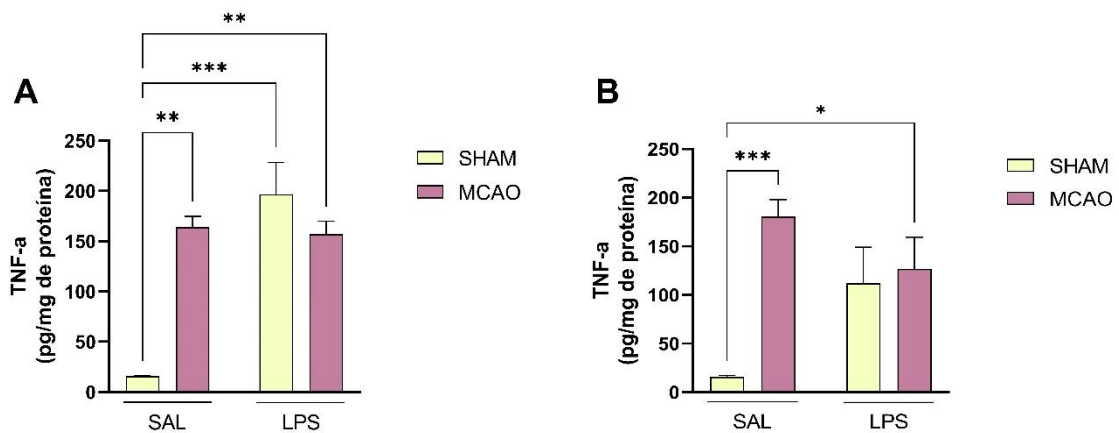


Figura 6: Níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 3-4$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de post hoc de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para comparações entre grupos.

Na figura abaixo, estão expostos os dados referentes aos níveis de IL-1 β na região do córtex frontal (figura 7A) e hipocampo (figura 7B). Os resultados mostraram que os grupos SAL+MCAO ($p = 0,0260$), LPS+SHAM ($p = 0,0223$) e LPS+MCAO ($p = 0,0237$) continham níveis maiores de IL-1 β quando comparados ao grupo controle. Ao mesmo passo, houve interação entre os fatores de exposição ao LPS na infância e o modelo aplicado ($F_{(1,9)} = 6,059$; $p = 0,0399$). Já na região do hipocampo não foram encontrados resultados significativos.

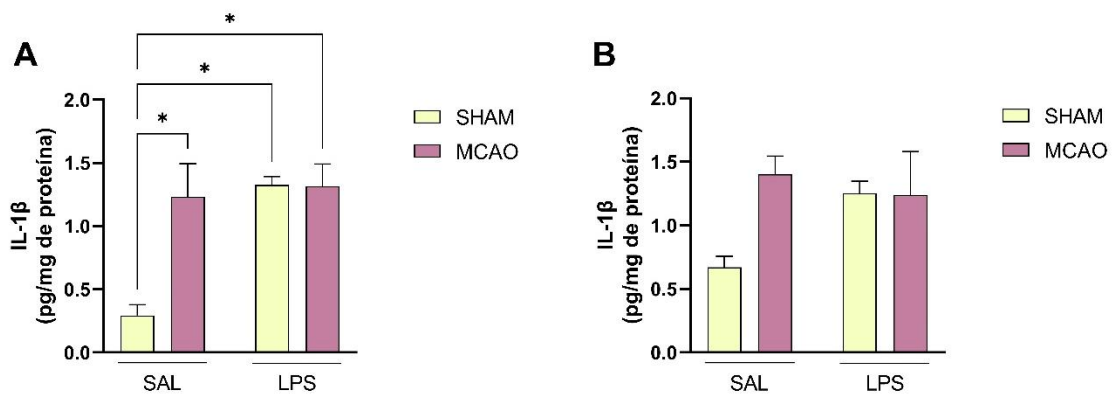


Figura 7: Níveis de IL-1 β no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 3-4$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de post hoc de Tukey. * $p < 0,05$ para comparações entre grupos.

Quanto aos níveis de IL-6, que estão dispostos na figura abaixo, na região do córtex frontal (figura 8A), os grupos SAL+MCAO ($p = 0,0146$) e LPS+MCAO ($p = 0,0718$)

mostraram resultados elevados em comparação ao grupo controle. Nesta região, não houve interação entre os fatores, mas tanto a exposição ao LPS na infância ($F_{(1, 13)} = 4,966$; $p = 0,0441$) quanto o modelo animal ($F_{(1, 13)} = 4,966$; $p = 0,0030$) exerceram efeitos sobre os resultados obtidos.

Já na região do hipocampo, ilustrado na figura 8B, os grupos SAL+MCAO ($p = 0,0010$), LPS+SHAM ($p = 0,0019$) e LPS+MCAO ($p = 0,008$) apresentaram aumento de IL-6 quando comparados ao grupo controle. Somado a isto, houve interação entre a exposição ao LPS na infância e o modelo animal aplicado ($F_{(1, 12)} = 11,87$; $p = 0,0048$).

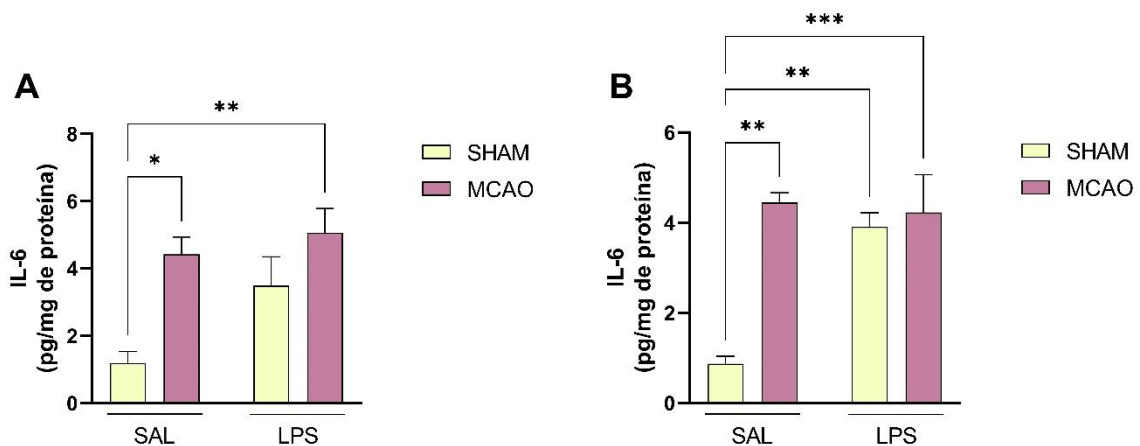


Figura 8: Níveis de IL-6 no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 3-5$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para comparações entre grupos.

Por último, sobre os parâmetros inflamatórios, na verificação dos níveis de IL-10 do córtex frontal (figura 9A), houve diminuição da citocina nos grupos SAL+MCAO, LPS+SHAM e LPS+MCAO ($p < 0,0001$ para todos), em comparação ao grupo controle. Além disso, houve interação ($F_{(1, 12)} = 137,3$; $p < 0,0001$) entre os fatores sobre os resultados encontrados.

Em concordância, na região do hipocampo (figura 9B), os grupos SAL+MCAO ($p < 0,0001$), LPS+SHAM ($p < 0,0001$) e LPS+MCAO ($p < 0,0003$) também mostraram níveis diminuídos de IL-10 em relação ao grupo controle. A exposição ao LPS na infância e o modelo animal exerceram efeito sobre os resultados através da interação ($F_{(1, 15)} = 23,51$; $p = 0,002$).

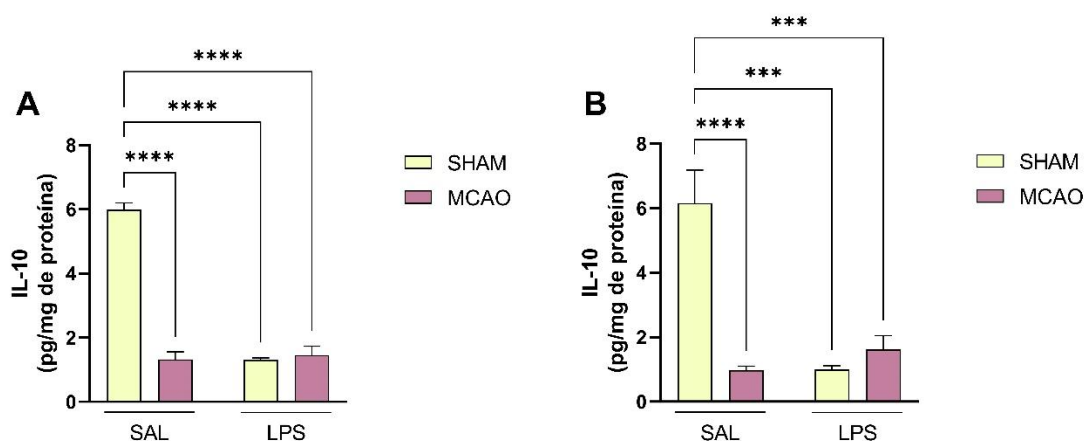


Figura 9: Níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 3-5$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para comparações entre grupos.

4.4. PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO APÓS AVC EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LPS

Para avaliar o efeito da exposição ao LPS no período da infância sobre o desfecho do AVC induzido na vida adulta, foi investigado parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no cérebro de ratos. Para isso, técnicas como atividade da enzima MPO, concentração de nitrito/nitrato, atividade da enzima SOD, atividade da enzima CAT, dosagem de MDA equivalente e o conteúdo de sulfidrilas, foram realizadas nas regiões de córtex frontal e hipocampo.

Como primeiro resultado encontrado, a atividade da enzima MPO se mostrou elevada nos grupos SAL+MCAO ($p = 0,0208$) e LPS+MCAO ($p = 0,0376$), quando comparados ao grupo controle na região do córtex frontal (figura 10A). Para estes resultados, o modelo utilizado exerceu efeito principal ($F_{(1, 19)} = 10,34$; $p = 0,0046$).

Já na região do hipocampo (figura 10B), a atividade da enzima MPO também se mostrou elevada no grupo SAL+MCAO ($p = 0,0439$), quando comparada ao grupo controle. Interessantemente, para estes resultados, houve interação dos efeitos da exposição ao LPS no período da infância e do MCAO na idade adulta ($F_{(1, 18)} = 7,127$; $p = 0,0156$).

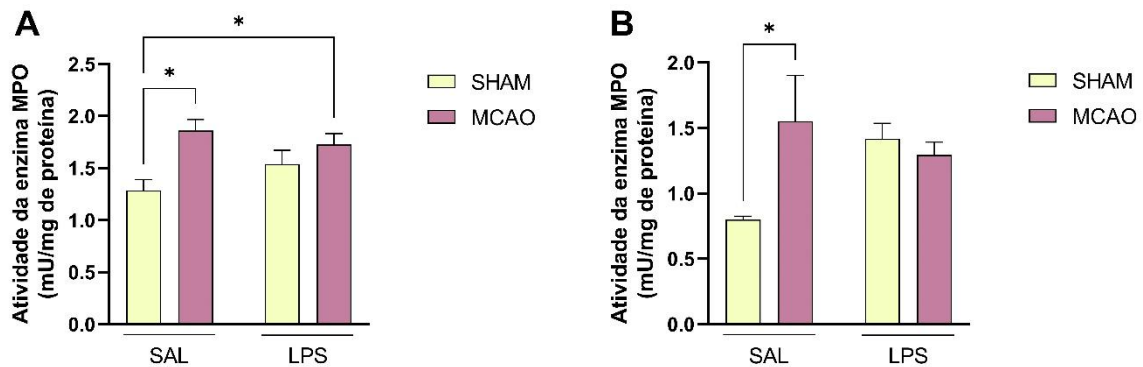


Figura 10: Atividade da enzima MPO no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 4-8$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ para comparações entre grupos.

Sobre a concentração de nitrito/nitrato na região do córtex frontal (figura 11A), está se mostrou alterada no grupo SAL+MCAO ($p = 0,0005$), onde estava elevada em comparação ao grupo controle. De modo interessante, a exposição ao LPS na infância reverteu as alterações causadas pelo modelo MCAO no grupo LPS+MCAO ($p = 0,0004$), quando comparado ao grupo SAL+MCAO. Da mesma forma, o grupo LPS+SHAM também mostrou concentração menor de nitrito/nitrato quando comparado ao grupo SAL+MCAO ($p = 0,0078$). Corroborando aos achados no córtex frontal, foi encontrado interação de efeito dos dois fatores envolvidos ($F_{(1, 18)} = 24,18$; $p = 0,0001$). Porém, não foram encontrados resultados significativos na região do hipocampo (figura 11B).

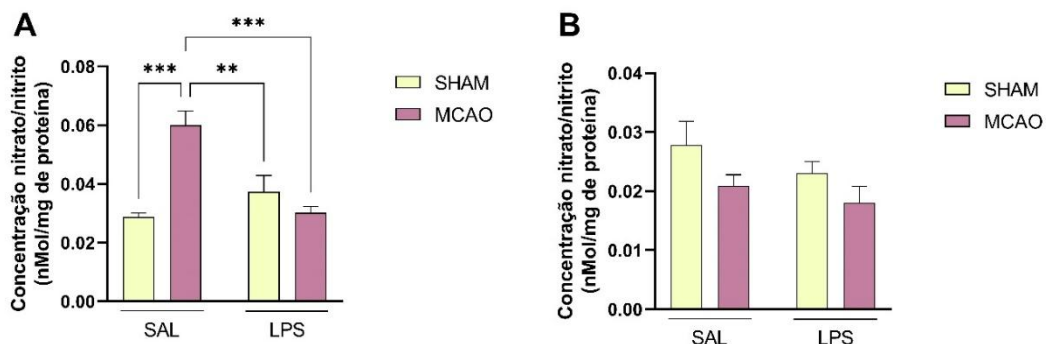


Figura 11: Concentração de nitrato/nitrito no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 4-8$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para comparações entre grupos.

Em relação à atividade da enzima SOD no córtex frontal (figura 12A), não foram encontradas diferenças significativas. Em contrapartida, na região do hipocampo (figura 12B), os grupos SAL+MCAO ($p = 0,0038$), LPS+SHAM ($p = 0,0024$) e LPS+MCAO ($p = 0,0219$) apresentaram atividade da enzima SOD diminuída em comparação ao grupo controle. Além disso, também houve interação dos dois fatores ($F_{(1, 20)} = 14,44$; $p = 0,0011$) sobre os resultados.

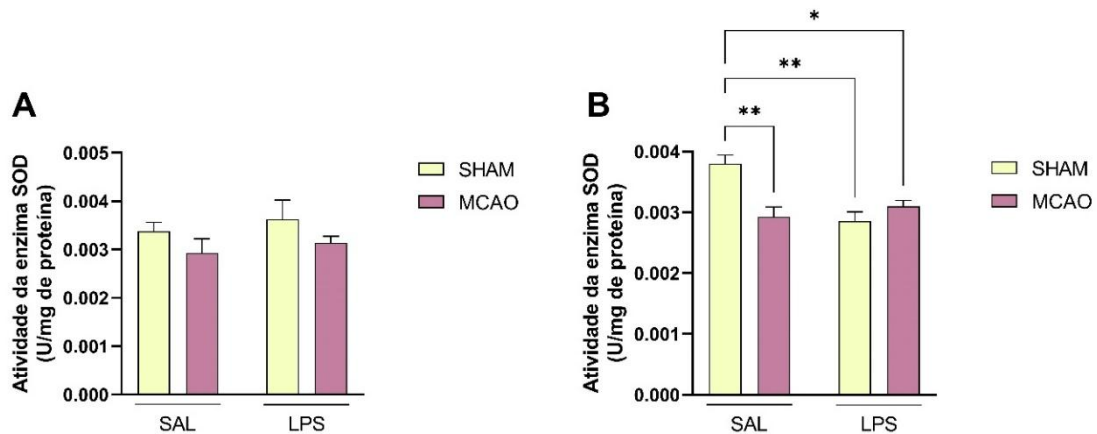


Figura 12: Atividade da enzima SOD no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 4-7$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ e $p < 0,01$ para comparações entre grupos.

Outra atividade enzimática investigada, foi a da CAT. Na região do córtex frontal (figura 13A), os grupos SAL+MCAO ($p < 0,0001$) e LPS+SHAM ($p = 0,0002$) mostraram atividade reduzida desta enzima, em comparação ao grupo controle. Curiosamente, a exposição ao LPS mostrou atividade enzimática aumentada em relação ao grupo SAL+MCAO ($p = 0,0289$), revertendo os danos causados pelo MCAO. Ao encontro disto, houve interação dos efeitos dos dois fatores ($F_{(1, 14)} = 40,37$; $p < 0,0001$) estudados.

De modo semelhante, no hipocampo (figura 13B) os grupos SAL+MCAO ($p = 0,0068$) e LPS+MCAO ($p = 0,0031$) também resultaram em diminuição da atividade da enzima CAT, quando comparado ao grupo controle. Além disso, os animais do grupo previamente exposto ao LPS e que foram submetidos ao MCAO (LPS+MCAO), apresentaram atividade enzimática diminuída ($p = 0,0096$) em comparação ao LPS+SHAM. O principal efeito destes resultados foi por conta do modelo utilizado ($F_{(1, 14)} = 34,91$; $p < 0,0001$).

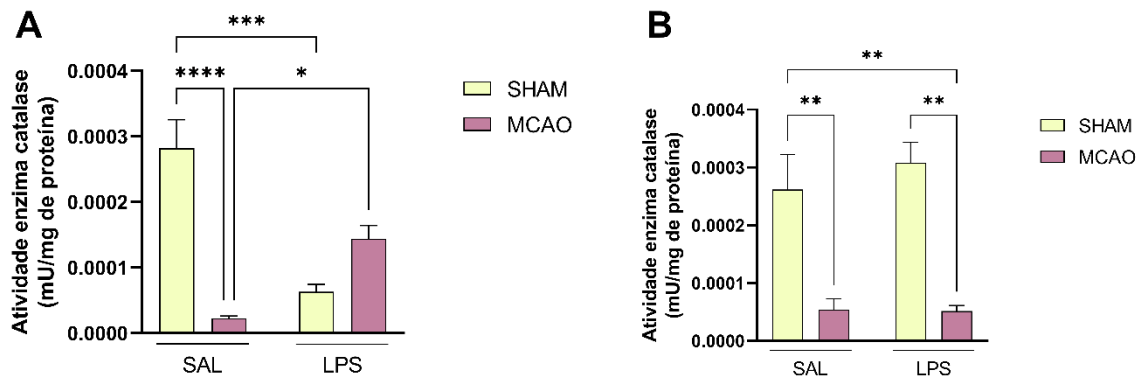


Figura 13: Atividade da enzima catalase no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 4-5$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ para comparações entre grupos.

Na dosagem de danos em lipídios através das medidas de MDA equivalente, foi possível observar que não houve diferenças significativas entre os grupos na região do córtex frontal (figura 14A). No entanto, esses efeitos foram exercidos por uma interação entre os fatores ($F_{(1, 19)} = 5,161$; $p = 0,0349$).

Diferentemente, na região do hipocampo (figura 14B), o grupo SAL+MCAO apresentou aumento em comparação ao grupo controle ($p = 0,0342$). Já o grupo de animais submetidos ao MCAO na idade adulta, mas que foram expostos ao LPS na infância (LPS+MCAO), apresentaram MDA equivalente diminuída em comparação com o grupo MCAO sem exposição prévia ao LPS (SAL+MCAO) ($p = 0,0094$). Em concordância a isto, houve interação entre os fatores sobre os resultados encontrados ($F_{(1, 14)} = 9,997$; $p = 0,0069$).

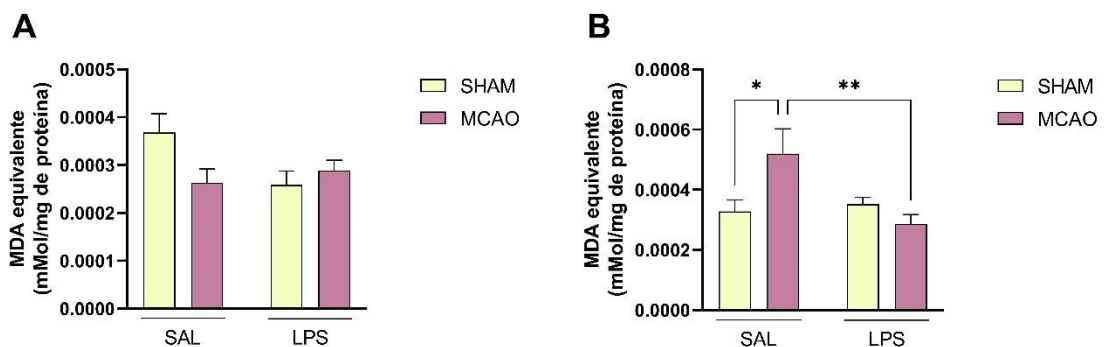


Figura 14: Medida de MDA equivalente no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 5-6$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para comparações entre grupos.

Por fim, a última técnica aplicada, foi para a verificação do conteúdo de sulfidrilas, sendo que no córtex frontal (figura 15A) não houve resultados significativos. Por outro lado, no hipocampo (figura 15B), os grupos SAL+MCAO ($p = 0,0140$) e LPS+MCAO ($p = 0,0344$) mostraram níveis diminuídos dos conteúdos de sulfidrilas presentes nas amostras, em comparação ao grupo controle. Além disso, o modelo escolhido exerceu efeito principal sobre os dados obtidos ($F_{(1, 14)} = 16,48$; $p = 0,0012$).

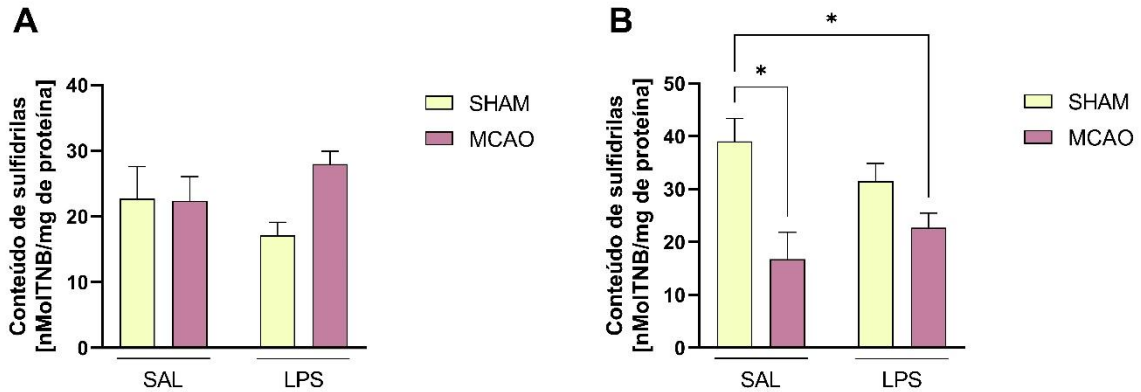


Figura 15: Conteúdo de sulfidrilas no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos ao MCAO após exposição ao LPS. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 3-7$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ para comparações entre grupos.

5. DISCUSSÃO

O AVC é a principal doença neurológica incapacitante a longo prazo, além de estar no pódio das doenças que mais causam mortes no Brasil e no mundo (Feigin *et al.*, 2022; Tsao *et al.*, 2023). Dada a isquemia e reperfusão existentes no AVCi, a fisiopatologia envolve uma resposta inflamatória vigorosa, contando com aumento exacerbado de citocinas pró-inflamatórias, diminuição de citocina anti-inflamatórias, além da presença do EO que pode gerar inúmeros danos às células do sistema nervoso central (SNC), estendendo ainda mais os danos (Ikeda *et al.*, 2013; Olmez e Ozyurt, 2012; Ren *et al.*, 2020). Com base nisso, a modulação imunológica vem sendo investigada como potencial forma terapêutica no desfecho do AVCi, com o objetivo de ponderar a inflamação causada (Wendeln *et al.*, 2018). Porém pouco se sabe sobre os efeitos dos mecanismos envolvidos na modulação imunológica infantil, sobre o AVCi na idade adulta.

O período pós-natal é uma janela de tempo crítica durante a qual um evento adverso pode ter efeitos significativos e duradouros no desenvolvimento do SNC e imunológico (Walker, Knott e Hodgson, 2008). Dentre as alterações que podem ocorrer, a comportamental é uma delas (Spencer, Heida e Pittman, 2005). No presente estudo, foi observado que uma única exposição ao LPS 50 µg/Kg via i.p. no DPN 14 é capaz de diminuir o tempo que os animais precisam para girar 180° no aparato de geotaxia negativa, realizado no DPN 15, onde iniciam com a cabeça voltada para baixo. Este teste é utilizado para verificar disfunção neurocomportamental através da função vestibular (Alberts, Motz e Schank, 2004b; Altman e Sudarshan, 1975) e essa foi a primeira vez que foi observado a geotaxia negativa 24 horas após exposição ao LPS 50 µg/Kg no DPN 14, visto que os outros estudos com metodologias de exposição infantil ao LPS em baixas dosagens não exploraram este parâmetro 24 horas após exposição.

Em contrapartida, Yeh e colaboradores (2021) e Rojas *et al.*, (2023) aplicaram LPS uma única vez no DPN 5, utilizando uma dosagem de 2 mg/Kg e 1 mg/Kg, respectivamente, consideradas doses altas e conhecidas como indutora de distúrbios neurocomportamentais e verificaram que os animais expostos ao LPS demoram mais tempo para completar a tarefa. Além disso, a aplicação de 50 µg/Kg logo após o nascimento de filhotes *Wistar*, mostraram levar menos tempo para girar do que os animais do grupo controle, mas isso foi avaliado 11 dias após a exposição (Saeedan *et al.*, 2018). Algo que pode explicar essa alteração um dia logo após a exposição ao LPS, está no estudo de Wendeln e colaboradores (2018), onde foi observado que no dia seguinte após a primeira injeção de LPS em baixa dose (500 µg/Kg), é o

momento com maiores níveis de citocinas inflamatórias e menores níveis de citocinas anti-inflamatórias. Esses dados em conjunto, podem sugerir que a dose baixa de LPS utilizada pode modular positivamente, mesmo que temporariamente, as respostas do neurodesenvolvimento e que a inflamação pode ter efeito sobre esses mecanismos, mas que doses altas podem ser prejudiciais aos mesmos.

Sabe-se que o peso adulto pode ser influenciado pela nutrição neonatal e ingestão de alimentos (Srinivasan *et al.*, 2003), e a exposição infantil ao LPS pode influenciar os níveis de leptina, que dentre suas funções, regula a saciedade e o peso (Otero *et al.*, 2005; Sachot, Poole e Luheshi, 2004; Sarraf *et al.*, 1997). No presente estudo, não foi observado alteração no ganho de peso dos animais antes e durante o tratamento. Contudo, houve uma diminuição no ganho de peso nas verificações subsequentes a finalização do protocolo de exposição ao LPS, assim como previamente verificado (Rojas *et al.*, 2023). Um estudo anterior verificou que a exposição a uma única dose de LPS no DPN 7 gerou um aumento da leptina, podendo ter ocorrido em resposta ao LPS ou às citocinas subsequentes produzidas (Spencer, Heida e Pittman, 2005). Assim como a exposição ao LPS e algumas citocinas podem modular o nível de leptina no desenvolvimento, a leptina também pode regular a produção de citocinas pró-inflamatórias (Loffreda *et al.*, 1998). Sendo que no presente estudo houve alteração no peso e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, é possível que os níveis de leptina também tenham sido alterados.

A “hipótese de duplo golpe” oferece a base para investigar a relação dinâmica entre múltiplos mecanismos, postulando que o “primeiro golpe” acontecido durante períodos críticos do desenvolvimento pode interromper a ontogenia do SNC e estabelecer uma suscetibilidade a um “segundo golpe” na vida adulta. Sendo assim, o “primeiro golpe” aplicado neste trabalho foram as doses repetidas de LPS entre os DPNs 14 e 17, período correspondente a fase da infância em humanos (Ghasemi, Jeddi e Kashfi, 2021), com o propósito de mimetizar as infecções que ocorrem durante a infância e dão razão a “teoria da higiene”. Portanto, o objetivo do LPS era modular os sistemas de resposta imunológica para que quando houvesse um “segundo golpe”, o AVCi, o sistema imunológico não respondesse de forma tão exacerbada.

Conforme encontrado anteriormente por Joaquim e colaboradores (2024) os dados obtidos mostraram que todos os animais que foram submetidos ao modelo de AVCi, induzido por MCAO, apresentaram déficit neurológico elevado em comparação com os animais do grupo controle, tanto uma hora, quando 24 horas após a isquemia. Inclusive, a exposição ao LPS repetidas vezes na infância não foi capaz de atenuar os danos causados pelo MCAO. No

entanto, a tolerância a endotoxina é caracterizada por atenuação da resposta inflamatória quando o organismo é exposto novamente àquele patógeno já conhecido (Bisas e Lopez-Collazo, 2009) e isto não parece ter ocorrido neste estudo, uma vez que o segundo insulto foi um insulto estéril, o MCAO.

Em contrapartida, a imunidade treinada é responsável por estruturar um mecanismo pró-inflamatório robusto contra desafios subsequentes e desconhecidos do sistema imune inato (Bekkering *et al.*, 2021). Essa teoria pode ajudar a explicar os acontecimentos dessa investigação, uma vez que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 se encontraram elevadas nas estruturas do córtex frontal e hipocampo dos animais submetidos ao MCAO e/ou expostos ao LPS. Além disso, a IL-10 se apresentou em níveis diminuídos nas mesmas regiões e nos mesmos grupos.

Em pacientes após AVCi e modelo animal de MCAO também foram encontrados níveis elevados de TNF- α (Joaquim *et al.*, 2024; Zhu *et al.*, 2022), assim como IL-1 β (Allan, Tyrrell e Rothwell, 2005; Joaquim *et al.*, 2024; Zhu *et al.*, 2022) e IL-6 (Joaquim *et al.*, 2024). Sendo a elevação dessa última pode ser associada ao reparo cerebrovascular (Choi *et al.*, 2023) e a ação sinérgica do TNF- α e IL-1 β na síntese de IL-6 (Joaquim *et al.*, 2024).

Ao avaliarem os efeitos inflamatórios após injeção de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de LPS no DPN 14, foi observado que após três horas da aplicação da endotoxina, tanto no plasma, quanto no hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala apresentaram expressão aumentadas de TNF- α , IL-1 β e IL-10 (Dinel *et al.*, 2014) Além disso, em um modelo animal de AVCi quatro semanas após a imunidade treinada, apenas uma dose de LPS (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$), foi capaz de induzir ativação microglial e aumentar a liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α pela micróglia, o que agrava ainda mais os danos cerebrais gerados pelo AVCi, (Feng *et al.*, 2020). No cérebro, a expressão de IL-1 β e TNF- α pode ser regulada por IL-10 (Strle *et al.*, 2001). Então é plausível que os níveis de IL-1 β e TNF- α estejam inversos ao nível de IL-10, sendo esta alteração possivelmente um efeito da imunidade treinada na infância.

Uma série de respostas contribui para o processo patológico de isquemia além da inflamação, como EO, recrutamento de células imunes e ativação da micróglia (Kim, Nogueira e Haussen, 2019). As lesões de reperfusão são causadas principalmente pelo EO e inflamação, sendo que o EO também pode desencadear uma resposta inflamatória (Cao *et al.*, 2023). Uma das primeiras células a chegar no cérebro após o AVCi ou em uma infecção, são os neutrófilos, assim que são recrutados para ativação e infiltração (Perez-de-Puig *et al.*, 2015) e são os grandes detentores da MPO. A atividade da enzima MPO foi intensificada após o AVC nos grupos submetidos ao MCAO em córtex frontal e hipocampo enquanto a

concentração de nitrato/nitrito, foi aumentada no córtex frontal. Porém, a exposição ao LPS na infância foi capaz de proteger somente o hipocampo contra o aumento apenas de nitrato/nitrito. Estudos anteriores mostraram atividade elevada de MPO após oito dias do MCAO (Joaquim *et al.*, 2024), assim como número de neutrófilos elevados no hemisfério isquêmico até uma semana após o MCAO transitório (Cai *et al.*, 2020), além de níveis maiores de MPO estarem positivamente relacionados com a gravidade do AVC em pacientes (Maestrini *et al.*, 2020). Porém, a exposição ao LPS na infância não protegeu o córtex frontal contra o aumento da atividade da MPO após MCAO.

O AVCi apresenta na clínica e em estudos pré-clínicos prejuízos neurológicos associados aos danos lipídicos e proteicos (Maxwell *et al.*, 1998). O MDA elevado reflete o dano lipídico decorrente do MCAO, sendo encontrado após 24 horas (Fu *et al.*, 2022). Já o dano associado às proteínas sulfidrilas podem ser verificados através da integridade dos conteúdos de sulfidrilas, que quanto menores estiverem, significa que mais dano oxidativo prejudicaram o sistema (Tang e Hsu, 1974). Os resultados mostraram que ambos os grupos submetidos ao MCAO apresentaram diminuição do conteúdo de sulfidrilas e que a exposição ao LPS na infância protegeu o hipocampo dos danos lipídicos, mas não dos danos às proteínas sulfidrilas.

Por fim, a defesa antioxidantes pode estar alterada no AVCi, como encontrado no presente estudo, onde os grupos submetidos ao MCAO apresentaram atividade diminuída das enzimas antioxidantes SOD, em hipocampo, e CAT em córtex frontal e hipocampo. O grupo exposto ao LPS também apresentou as duas enzimas diminuídas. No entanto, a exposição ao LPS não permitiu que a atividade da CAT fosse significativamente diminuída após o MCAO. Anteriormente estudos aplicando modelos de isquemia também encontraram diminuição da atividade da SOD após 14 dias (Fu *et al.*, 2022), e da CAT após oito dias (Joaquim *et al.*, 2024). Alguns pesquisadores abordam melhoras inflamatórias após a exposição ao LPS (Biswas e Lopez-Collazo, 2009). Logo, é possível que ele exerça proteção em alguns parâmetros de EO após segundo insulto, como ocorreu na concentração de nitrito e nitrato e na atividade da enzima CAT na região do córtex frontal, assim como no MDA equivalente no hipocampo.

Sendo assim, parece que a modulação imunológica no início da vida pode reprogramar as respostas imunológicas, alterando como o sistema imunológico adulto responde a um desafio imunológico subsequente. Seja por meio da produção prolongada ou exagerada de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da regulação anti-inflamatória ou o contrário. A literatura apresenta metodologias heterogêneas acerca do protocolo de exposição ao LPS,

sendo empregados diferentes sorotipos de LPS, período de exposição, período da vida do animal exposto e diversos tipos de segundo insulto. O período de exposição ao LPS entre o DPN 14 e DPN 21 já é bem consolidado e é considerado como uma “janela crítica” para os efeitos na resposta febril em animais adultos expostos novamente ao LPS. No entanto, devem existir outros pontos de tempo críticos durante o desenvolvimento para a programação de outros aspectos da fisiologia adulta, como o AVCi. De fato, Spencer, Heida e Pittman (2005) demonstraram que existem aspectos distintos na fisiologia adulta que dependem do segundo desafio e do período de desenvolvimento que o organismo foi exposto ao primeiro insulto.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra pela primeira vez os efeitos da exposição ao LPS sistêmico, na dosagem de 50 µg/kg, administrado repetidas vezes, no período correspondente à infância, sobre os parâmetros de desenvolvimento, respostas inflamatórias e de EO.

Tomados em conjunto, os resultados mostram que a exposição ao LPS não é capaz de modular como um todo o desfecho da inflamação e do EO nas regiões de córtex frontal e hipocampo, causados pelo MCAO. Mas sim, ele é capaz de realizar o treinamento da imunidade inata como visto em alguns parâmetros inflamatórios, o que poderia ser útil para outras patologias como segundo insulto.

Novos estudos investigando métodos de inibição da imunidade treinada poderão servir para o desenvolvimento de potenciais terapêuticos para o AVCi, assim como outros insultos secundários devem ser aplicados para destrinchar os mecanismos de modulação imunológica infantil.

REFERÊNCIAS

- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Lipid Oxidation and Peroxidation in CNS Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 1, p. 125–169, jan. 2010.
- AEBI, H. Catalase in vitro. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 121–126.
- AHO, K. *et al.* Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 1, p. 113–30, 1980.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, abr. 2001.
- ALBERTS, J. R.; MOTZ, B. A.; SCHANK, J. C. Positive Geotaxis in Infant Rats (*Rattus norvegicus*): A Natural Behavior and a Historical Correction. **Journal of Comparative Psychology**, v. 118, n. 2, p. 123–132, 2004a.
- _____. Positive Geotaxis in Infant Rats (*Rattus norvegicus*): A Natural Behavior and a Historical Correction. **Journal of Comparative Psychology**, v. 118, n. 2, p. 123–132, 2004b.
- ALLAN, S. M.; TYRRELL, P. J.; ROTHWELL, N. J. Interleukin-1 and neuronal injury. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 629–640, 20 ago. 2005.
- ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative Stress and Its Role in the Pathogenesis of Ischaemic Stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, n. 6, p. 461–470, 1 dez. 2009.
- ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behaviour**, v. 23, p. 896–920, nov. 1975.
- AMANZADA, A. *et al.* Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 135, n. 3, p. 305–315, 16 mar. 2011.
- ANRATHER, J.; IADECOLA, C. Inflammation and Stroke: An Overview. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 4, p. 661–670, out. 2016.
- BAHJAT, F. R. *et al.* Proof of Concept: Pharmacological Preconditioning with a Toll-like Receptor Agonist Protects against Cerebrovascular Injury in a Primate Model of Stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, n. 5, p. 1229–1242, 2 maio 2011.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for Superoxide Dismutase. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 279–312.
- BASTIDE, M. *et al.* Delayed Cerebrovascular Protective Effect of Lipopolysaccharide in Parallel to Brain Ischemic Tolerance. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 399–405, 31 abr. 2003.
- BEAL, M. F. Oxidative Metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 924, n. 1, p. 164–169, 25 dez. 2000.
- BEDERSON, J. B. *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke**, v. 17, n. 3, p. 472–476, maio 1986a.
- _____. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke**, v. 17, n. 3, p. 472–476, maio 1986b.
- BEKKERING, S. *et al.* Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 667–693, 26 abr. 2021.
- BENN, C. S. *et al.* A small jab – a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 9, p. 431–439, set. 2013.
- BISWAS, S. K.; LOPEZ-COLLAZO, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 10, p. 475–487, out. 2009.
- BJÖRKSTÉN *et al.* The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 29, n. 3, p. 342–346, 24 mar. 1999.

- BJORKSTEN, B. *et al.* Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe. **European Respiratory Journal**, v. 12, n. 2, p. 432–437, 1 ago. 1998.
- BLUHMKI, E. *et al.* Stroke treatment with alteplase given 3·0–4·5 h after onset of acute ischaemic stroke (ECASS III): additional outcomes and subgroup analysis of a randomised controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 12, p. 1095–1102, dez. 2009.
- BOISSÉ, L. *et al.* Long-Term Alterations in Neuroimmune Responses after Neonatal Exposure to Lipopolysaccharide. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 21, p. 4928–4934, 26 maio 2004.
- BOWDISH, D. M. E. *et al.* Macrophage receptors implicated in the “adaptive” form of innate immunity. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 14–15, p. 1680–1687, nov. 2007.
- BRACHMANN, J. *et al.* Uncovering Atrial Fibrillation Beyond Short-Term Monitoring in Cryptogenic Stroke Patients. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 9, n. 1, jan. 2016.
- BROAD, A.; KIRBY, J. A.; JONES, D. E. J. Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon- β production. **Immunology**, v. 120, n. 1, p. 103–111, 16 jan. 2007.
- CAI, W. *et al.* Functional Dynamics of Neutrophils After Ischemic Stroke. **Translational Stroke Research**, v. 11, n. 1, p. 108–121, 7 fev. 2020.
- CAMPBELL, B. C. V. *et al.* Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 11, p. 1009–1018, 12 mar. 2015.
- CAO, Y. *et al.* Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for ischemic stroke. **Heliyon**, v. 9, n. 7, p. e17986, jul. 2023.
- CASTELLO, P. R. *et al.* Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 277–287, abr. 2006.
- CHOI, B.-R. *et al.* Monocyte-derived IL-6 programs microglia to rebuild damaged brain vasculature. **Nature Immunology**, v. 24, n. 7, p. 1110–1123, 29 jul. 2023.
- CHOI, D. W.; ROTHMAN, S. M. The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death. **Annual Review of Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 171–182, mar. 1990.
- CHUGH, C. Acute Ischemic Stroke: Management Approach. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 23, n. S2, p. 140–146, 1 jun. 2019.
- CLARKE, E. APOPLEXY IN THE HIPPOCRATIC WRITINGS. **Bulletin of the history of medicine**, v. 37, p. 301–14, 1963.
- COSTA, M. A. *et al.* Effects of Cannabidiol Isolated or in Association With Risperidone in an Animal Model of Autism. **Developmental neurobiology**, 85(1), e22955.
- DAMLE, S. S. *et al.* Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Induces Heme Oxygenase-1 in the Heart and Lung but Not Brain. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 208, n. 4, p. 592–598, abr. 2009.
- DAWSON, D. A. *et al.* Cerebrovascular Hemodynamics and Ischemic Tolerance: Lipopolysaccharide-Induced Resistance to Focal Cerebral Ischemia is not Due to Changes in Severity of the Initial Ischemic Insult, but is Associated with Preservation of Microvascular Perfusion. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 19, n. 6, p. 616–623, 31 jun. 1999.
- DELONG, J. H. *et al.* Inflammatory Responses After Ischemic Stroke. **Seminars in Immunopathology**, v. 44, n. 5, p. 625–648, 29 set. 2022.
- DINEL, A.-L. *et al.* Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 155, 17 dez. 2014.

- DING, F. *et al.* Low-Dose LPS Induces Tolerogenic Treg Skewing in Asthma. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 23 set. 2020.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 421–431.
- EKKERT, A. *et al.* Ischemic Stroke Genetics: What Is New and How to Apply It in Clinical Practice? **Genes**, v. 13, n. 1, p. 48, 24 dez. 2021.
- FAN, H.; COOK, J. A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. **Journal of Endotoxin Research**, v. 10, n. 2, p. 71–84, 1 abr. 2004.
- FEIGIN, V. L. *et al.* Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Neurology**, v. 20, n. 10, p. 795–820, out. 2021.
- _____. World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. **International Journal of Stroke**, v. 17, n. 1, p. 18–29, 5 jan. 2022.
- FENG, Y. *et al.* hUCMSCs Mitigate LPS-Induced Trained Immunity in Ischemic Stroke. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 11 set. 2020.
- FESKE, S. K. Ischemic Stroke. **The American Journal of Medicine**, v. 134, n. 12, p. 1457–1464, dez. 2021.
- FINGER, S.; BOLLER, F.; TYLER, K. L. **History of neurology**. [s.l.] Elsevier , 2009.
- FLORENTINO, D. *et al.* Early life neuroimmune challenge protects the brain after sepsis in adult rats. **Neurochemistry International**, v. 135, p. 104712, maio 2020.
- FU, C. *et al.* Rehmamioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis via activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 289, p. 115021, maio 2022.
- GALANOS, C. *et al.* Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 148, n. 1, p. 1–5, 3 abr. 1985.
- GELDERBLOM, M. *et al.* Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. **Stroke**, v. 40, n. 5, p. 1849–1857, maio 2009.
- GEORGE, M. G. *et al.* CDC Grand Rounds: Public Health Strategies to Prevent and Treat Strokes. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 18, p. 479–481, 12 maio 2017.
- GERRARD, J. W. *et al.* Serum IgE levels in white and metis communities in Saskatchewan. **Annals of allergy**, v. 37, n. 2, p. 91–100, ago. 1976.
- GHASEMI, A.; JEDDI, S.; KASHFI, K. The laboratory rat: Age and body weight matter. **Excli Journal**, v. 20, p. 1431–1445, 23 set. 2021.
- GHOZY, S. *et al.* Physical activity level and stroke risk in <sc>US</sc> population: A matched case–control study of 102,578 individuals. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 9, n. 3, p. 264–275, 30 mar. 2022.
- GIDDAY, J. M. *et al.* Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 2, p. H558–H568, ago. 2005.
- GONG, S. *et al.* Validation of risk scoring models for predicting stroke-associated pneumonia in patients with ischaemic stroke. **BMJ**, v. 1, n. 3, p. 122–126, set. 2016.
- GOYAL, M. *et al.* Randomized Assessment of Rapid Endovascular Treatment of Ischemic Stroke. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 11, p. 1019–1030, 12 mar. 2015.
- GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biology**, v. 6, p. 524–551, dez. 2015.
- GUO, J. *et al.* Association between blood pressure categories and cardiovascular disease mortality in China. **PLOS ONE**, v. 16, n. 7, p. e0255373, 30 jul. 2021.

- HACKE, W. *et al.* Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. **The Lancet**, v. 363, n. 9411, p. 768–774, mar. 2004.
- HANKEY, G. J. Stroke. **The Lancet**, v. 389, n. 10069, p. 641–654, fev. 2017.
- HARARI, O. A.; LIAO, J. K. NF- κ B and innate immunity in ischemic stroke. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1207, n. 1, p. 32–40, 7 out. 2010.
- HICKEY, E. J. *et al.* Lipopolysaccharide preconditioning induces robust protection against brain injury resulting from deep hypothermic circulatory arrest. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 133, n. 6, p. 1588–1596, jun. 2007.
- HU, X. *et al.* circGSK3 β promotes metastasis in esophageal squamous cell carcinoma by augmenting β -catenin signaling. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 160, 14 dez. 2019.
- HUA, F. *et al.* Preconditioning with a TLR2 specific ligand increases resistance to cerebral ischemia/reperfusion injury. **Journal of Neuroimmunology**, v. 199, n. 1–2, p. 75–82, ago. 2008.
- HUANG, J.; UPADHYAY, U. M.; TAMARGO, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surgical Neurology**, v. 66, n. 3, p. 232–245, set. 2006.
- HUANG, Y. *et al.* Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, p. i5953, 23 nov. 2016.
- IKEDA, S. *et al.* Effects of Edaravone, a Free Radical Scavenger, on Photochemically Induced Cerebral Infarction in a Rat Hemiplegic Model. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- IOANNOU, A.; LUCCA, J. D.; TSOKOS, G. C. Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 1, p. 3–14, out. 2011.
- IRNELL, L.; KIVILOOG, J. Bronchial asthma and chronic bronchitis in a Swedish urban and rural population. With special reference to prevalence, respiratory function and socio-medical condition. **Scandinavian journal of respiratory diseases. Supplementum**, v. 66, p. 1–86, 1968.
- JOAQUIM, L. S. *et al.* Sepsis compromises post-ischemic stroke neurological recovery and is associated with sex differences. **Life Sciences**, v. 349, p. 122721, jul. 2024.
- JOVIN, T. G. *et al.* Thrombectomy within 8 Hours after Symptom Onset in Ischemic Stroke. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 24, p. 2296–2306, 11 jun. 2015.
- KALOGERIS, T. *et al.* Ischemia/Reperfusion. *Em: Comprehensive Physiology*. [s.l.] Wiley, 2016. p. 113–170.
- KATAN, M.; LUFT, A. Global Burden of Stroke. **Seminars in Neurology**, v. 38, n. 02, p. 208–211, 23 abr. 2018.
- KIM, S. J.; NOGUEIRA, R. G.; HAUSSEN, D. C. Current Understanding and Gaps in Research of Carotid Webs in Ischemic Strokes. **JAMA Neurology**, v. 76, n. 3, p. 355, 1 mar. 2019.
- KLEINDORFER, D. O. *et al.* Stroke Incidence Is Decreasing in Whites But Not in Blacks. **Stroke**, v. 41, n. 7, p. 1326–1331, jul. 2010.
- KLEINNIJENHUIS, J. *et al.* Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17537–17542, 23 out. 2012.
- _____. Long-Lasting Effects of BCG Vaccination on Both Heterologous Th1/Th17 Responses and Innate Trained Immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 2, p. 152–158, 2014.
- KRISTIÁN, T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. **Cell Calcium**, v. 36, n. 3–4, p. 221–233, set. 2004.

- KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 3, p. 556–592, fev. 2012.
- LANSBERG, M. G. *et al.* Antithrombotic and Thrombolytic Therapy for Ischemic Stroke. **Chest**, v. 141, n. 2, p. e601S–e636S, fev. 2012.
- LEE, J.-M. *et al.* Brain tissue responses to ischemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 6, p. 723–731, 15 set. 2000.
- LEVINE, R. L. *et al.* [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 464–478.
- LI, P. *et al.* The Effects of Twist-2 on Liver Endotoxin Tolerance Induced by a Low Dose of Lipopolysaccharide. **Inflammation**, v. 37, n. 1, p. 55–64, 5 fev. 2014.
- LIESZ, A. *et al.* DAMP Signaling is a Key Pathway Inducing Immune Modulation after Brain Injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 583–598, 14 jan. 2015.
- LIEW, F. Y. *et al.* Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 6, p. 446–458, jun. 2005.
- LOFFREDA, S. *et al.* Leptin regulates proinflammatory immune responses. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 1, p. 57–65, jan. 1998.
- LÓPEZ-COLLAZO, E.; FRESNO, C. DEL. Endotoxin tolerance and trained immunity: breaking down immunological memory barriers. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 29 abr. 2024.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.
- LUENGO-FERNANDEZ, R. *et al.* Economic burden of stroke across Europe: A population-based cost analysis. **European Stroke Journal**, v. 5, n. 1, p. 17–25, 29 mar. 2020.
- LUND, C.; DAHL, A.; RUSSELL, D. Transitorisk iskemisk anfall. **TIDSSKRIFT FOR DEN NORSKE LEGEFORENING**, v. 127, n. 900–2, 29 mar. 2007.
- MAESTRINI, I. *et al.* Analysis of the association of MPO and MMP-9 with stroke severity and outcome. **Neurology**, v. 95, n. 1, 7 jul. 2020.
- MANZANERO, S.; SANTRO, T.; ARUMUGAM, T. V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 712–718, abr. 2013.
- MARSH, B. *et al.* Systemic Lipopolysaccharide Protects the Brain from Ischemic Injury by Reprogramming the Response of the Brain to Stroke: A Critical Role for IRF3. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 31, p. 9839–9849, 5 ago. 2009.
- MAXWELL, S. *et al.* Oxidative stress after thrombolysis. **The Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 960, set. 1998.
- MCDONALD, B. *et al.* Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362–366, 15 out. 2010.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, CHARLES. J. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Reviews**, v. 173, n. 1, p. 89–97, fev. 2000.
- MIRANDA, M. *et al.* **Números do AVC**.
- MOLINARO, A. *et al.* Chemistry of Lipid A: At the Heart of Innate Immunity. **Chemistry – A European Journal**, v. 21, n. 2, p. 500–519, 7 jan. 2015.
- MUTIUS, E. VON; RADON, K. Living on a Farm: Impact on Asthma Induction and Clinical Course. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 631–647, ago. 2008.
- NALEWAY, A. L. Asthma and Atopy in Rural Children: Is Farming Protective? **Clinical Medicine & Research**, v. 2, n. 1, p. 5–12, 1 fev. 2004.
- NETEA, M. G. *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. **Science**, v. 352, n. 6284, 22 abr. 2016.

- NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 5, p. 355–361, maio 2011.
- NIJBOER, C. H. A. *et al.* Strong Neuroprotection by Inhibition of NF- κ B After Neonatal Hypoxia-Ischemia Involves Apoptotic Mechanisms but Is Independent of Cytokines. **Stroke**, v. 39, n. 7, p. 2129–2137, jul. 2008.
- O'DONNELL, M. J. *et al.* Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. **The Lancet**, v. 376, n. 9735, p. 112–123, jul. 2010.
- OFFNER, H. *et al.* Experimental Stroke Induces Massive, Rapid Activation of the Peripheral Immune System. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 654–665, 24 maio 2006.
- OLMEZ, I.; OZYURT, H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. **Neurochemistry International**, v. 60, n. 2, p. 208–212, jan. 2012.
- OTERO, M. *et al.* Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Letters**, v. 579, n. 2, p. 295–301, 17 jan. 2005.
- PALLAST, S. *et al.* 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 3, p. 882–889, 12 nov. 2009.
- PAOLUCCI, S. *et al.* Functional Outcome of Ischemic and Hemorrhagic Stroke Patients After Inpatient Rehabilitation. **Stroke**, v. 34, n. 12, p. 2861–2865, dez. 2003.
- PEREZ-DE-PUIG, I. *et al.* Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 2, p. 239–257, 30 fev. 2015.
- PETERS, S. A. E.; HUXLEY, R. R.; WOODWARD, M. Smoking as a Risk Factor for Stroke in Women Compared With Men. **Stroke**, v. 44, n. 10, p. 2821–2828, out. 2013.
- POUND, P.; BURY, M.; EBRAHIM, S. From apoplexy to stroke. **Age and Ageing**, v. 26, n. 5, p. 331–337, 1997.
- POWERS, W. J. *et al.* 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 49, n. 3, mar. 2018.
- _____. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 50, n. 12, dez. 2019.
- QUINTIN, J. *et al.* Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. **Current Opinion in Immunology**, v. 29, p. 1–7, ago. 2014.
- RADON, K.; SCHULZE, A.; NOWAK, D. Inverse association between farm animal contact and respiratory allergies in adulthood: protection, underreporting or selection? **Allergy**, v. 61, n. 4, p. 443–446, 27 abr. 2006.
- REN, X. *et al.* Blood substitution therapy rescues the brain of mice from ischemic damage. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4078, 25 ago. 2020.
- ROCHMAH, T. N. *et al.* Economic Burden of Stroke Disease: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 14, p. 7552, 15 jul. 2021.
- ROJAS, D. B. *et al.* Lipopolysaccharide impairs neurodevelopment and induces changes in astroglial reactivity, antioxidant defenses and bioenergetics in the cerebral cortex of neonatal rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 83, n. 7, p. 600–614, 21 nov. 2023.
- ROSELL, A. *et al.* Increased Brain Expression of Matrix Metalloproteinase-9 After Ischemic and Hemorrhagic Human Stroke. **Stroke**, v. 37, n. 6, p. 1399–1406, jun. 2006.

- _____. MMP-9–Positive Neutrophil Infiltration Is Associated to Blood–Brain Barrier Breakdown and Basal Lamina Type IV Collagen Degradation During Hemorrhagic Transformation After Human Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 39, n. 4, p. 1121–1126, abr. 2008.
- ROSENZWEIG, H. L. *et al.* Endotoxin Preconditioning Prevents Cellular Inflammatory Response During Ischemic Neuroprotection in Mice. **Stroke**, v. 35, n. 11, p. 2576–2581, nov. 2004.
- ROSENZWEIG, H. L. *et al.* Endotoxin Preconditioning Protects against the Cytotoxic Effects of TNF α after Stroke: A Novel Role for TNF α in LPS-Ischemic Tolerance. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, n. 10, p. 1663–1674, 28 out. 2007.
- RYCK, M. DE *et al.* Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. **Stroke**, v. 20, n. 10, p. 1383–1390, out. 1989.
- SACCO, R. L. *et al.* An Updated Definition of Stroke for the 21st Century. **Stroke**, v. 44, n. 7, p. 2064–2089, jul. 2013.
- SACHOT, C.; POOLE, S.; LUHESHI, G. N. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. **The Journal of Physiology**, v. 561, n. 1, p. 263–272, 23 nov. 2004.
- SAEEDAN, A. S. *et al.* Effect of early natal supplementation of paracetamol on attenuation of exotoxin/endotoxin induced pyrexia and precipitation of autistic like features in albino rats. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 951–961, 11 ago. 2018.
- SAIA, R. S. *et al.* Neonatal endotoxin exposure changes neuroendocrine, cardiovascular function and mortality during polymicrobial sepsis in adult rats. **Regulatory Peptides**, v. 169, n. 1–3, p. 21–30, ago. 2011a.
- _____. Neonatal endotoxin exposure changes neuroendocrine, cardiovascular function and mortality during polymicrobial sepsis in adult rats. **Regulatory Peptides**, v. 169, n. 1–3, p. 21–30, ago. 2011b.
- SARIKAYA, H.; FERRO, J.; ARNOLD, M. Stroke Prevention - Medical and Lifestyle Measures. **European Neurology**, v. 73, n. 3–4, p. 150–157, 2015.
- SARRAF, P. *et al.* Multiple Cytokines and Acute Inflammation Raise Mouse Leptin Levels: Potential Role in Inflammatory Anorexia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 1, p. 171–176, 6 jan. 1997.
- SCHUTTA, H. S. Morgagni on Apoplexy in *De Sedibus* : A Historical Perspective. **Journal of the History of the Neurosciences**, v. 18, n. 1, p. 1–24, 7 jan. 2009.
- SCHUTTA, H. S.; HOWE, H. M. Seventeenth Century Concepts of “Apoplexy” as Reflected in Bonet’s “Sepulchretum”. **Journal of the History of the Neurosciences**, v. 15, n. 3, p. 250–268, set. 2006.
- SEISKARI, T. *et al.* Allergic sensitization and microbial load – a comparison between Finland and Russian Karelia. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 148, n. 1, p. 47–52, 7 fev. 2007.
- SEKERDAG, E.; SOLAROGLU, I.; GURSOY-OZDEMIR, Y. Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 9, p. 1396–1415, 5 out. 2018.
- SHI, H. *et al.* Corrigendum: Schisandrin B Antagonizes Cardiotoxicity Induced by Pirarubicin by Inhibiting Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Opening and Decreasing Cardiomyocyte Apoptosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 11 nov. 2021.
- SHOBHA, N.; BUCHAN, A. M.; HILL, M. D. Thrombolysis at 3–4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke Onset – Evidence from the Canadian Alteplase for Stroke Effectiveness Study (CASES) Registry. **Cerebrovascular Diseases**, v. 31, n. 3, p. 223–228, 2011.
- SMEDING, L. *et al.* Aggravation of myocardial dysfunction by injurious mechanical ventilation in LPS-induced pneumonia in rats. **Respiratory Research**, v. 14, n. 1, p. 92, 18 dez. 2013.

- SPENCER, S. J. *et al.* Early-Life Immune Challenge: Defining a Critical Window for Effects on Adult Responses to Immune Challenge. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1910–1918, 4 set. 2006.
- SPENCER, S. J.; HEIDA, J. G.; PITTMAN, Q. J. Early life immune challenge—effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 164, n. 2, p. 231–238, nov. 2005.
- SPOSATO, L. A. *et al.* Diagnosis of atrial fibrillation after stroke and transient ischaemic attack: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 377–387, abr. 2015.
- SRINIVASAN, M. *et al.* Neonatal Nutrition: Metabolic Programming of Pancreatic Islets and Obesity¹. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 1, p. 15–23, 29 jan. 2003.
- STEVENS, S. L. *et al.* Toll-Like Receptor 9: A New Target of Ischemic Preconditioning in the Brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 1040–1047, 9 maio 2008.
- STEVENS, S. L. *et al.* Multiple Preconditioning Paradigms Converge on Interferon Regulatory Factor-Dependent Signaling to Promote Tolerance to Ischemic Brain Injury. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 23, p. 8456–8463, 8 jun. 2011.
- STOREY, C. E.; POLS, H. Chapter 27 A history of cerebrovascular disease. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 401–415.
- STRACHAN, D. Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. **Thorax**, v. 55, n. 90001, p. 2S – 10, 1 ago. 2000.
- STRLE, K. *et al.* Interleukin-10 in the Brain. **Critical ReviewsTM in Immunology**, v. 21, n. 5, p. 23, 2001.
- SUN, L. *et al.* Causal associations of blood lipids with risk of ischemic stroke and intracerebral hemorrhage in Chinese adults. **Nature Medicine**, v. 25, n. 4, p. 569–574, 11 abr. 2019.
- SUN, Y. *et al.* Effects of Aging on Endotoxin Tolerance Induced by Lipopolysaccharides Derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39224, 18 jun. 2012.
- TANG, C. L.; HSU, R. Y. Mechanism of Pigeon Liver Malic Enzyme. Modification of Sulfhydryl Groups by 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) and N-Ethylmaleimide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 12, p. 3916–3922, jun. 1974.
- TANG, L. *et al.* Apocynin Attenuates Cerebral Infarction after Transient Focal Ischaemia in Rats. **Journal of International Medical Research**, v. 35, n. 4, p. 517–522, 25 jul. 2007.
- TASAKI, K. *et al.* Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. **Brain Research**, v. 748, n. 1–2, p. 267–270, fev. 1997.
- TSAO, C. W. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2023 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 147, n. 8, 21 fev. 2023.
- VARTANIAN, K. B. *et al.* LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 140, 14 dez. 2011.
- WALKER, F. R.; KNOTT, B.; HODGSON, D. M. Neonatal endotoxin exposure modifies the acoustic startle response and circulating levels of corticosterone in the adult rat but only following acute stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 42, n. 13, p. 1094–1103, out. 2008.
- WANG, Y.; WANG, S.; SHEIBANI, N. Enhanced proangiogenic signaling in thrombospondin-1-deficient retinal endothelial cells. **Microvascular Research**, v. 71, n. 3, p. 143–151, maio 2006.

- WATANABE, T. *et al.* Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 268, n. 3, p. 1597–604, mar. 1994.
- WENDELN, A.-C. *et al.* Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. **Nature**, v. 556, n. 7701, p. 332–338, 11 abr. 2018.
- WEST, M. A.; HEAGY, W. Endotoxin tolerance: A review. **Critical care medicine**, v. 30, n. 1 Supp, p. S64–S73, jan. 2002.
- WESTENDORP, W. F. *et al.* Post-stroke infection: A systematic review and meta-analysis. **BMC Neurology**, v. 11, n. 1, p. 110, 20 dez. 2011.
- WHITFIELD, C.; TRENT, M. S. Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 99–128, 2 jun. 2014.
- XING, Y. *et al.* Immune modulation by rural exposures and allergy protection. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 35, n. 2, 14 fev. 2024.
- YAGHI, S. *et al.* Lacunar stroke: mechanisms and therapeutic implications. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 92, n. 8, p. 823–830, ago. 2021.
- YEH, J.-H. *et al.* Pioglitazone Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Behavioral Impairment, Brain Inflammation, White Matter Injury and Mitochondrial Dysfunction in Neonatal Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6306, 11 jun. 2021.
- YILMAZ, G.; GRANGER, D. N. Leukocyte Recruitment and Ischemic Brain Injury. **NeuroMolecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 193–204, 5 jun. 2010.
- YOSHIOKA, H. *et al.* NADPH Oxidase Mediates Striatal Neuronal Injury after Transient Global Cerebral Ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, n. 3, p. 868–880, 22 mar. 2011.
- YOUNG, L. M. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3–4, p. 335–341, mar. 1989.
- ZHANG, L. *et al.* Diabetes As an Independent Risk Factor for Stroke Recurrence in Ischemic Stroke Patients: An Updated Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 55, n. 6, p. 427–435, 2021.
- ZHENG, H. *et al.* Stroke recovery and rehabilitation in 2016: a year in review of basic science and clinical science. **Stroke and Vascular Neurology**, v. 2, n. 4, p. 222–229, dez. 2017.
- ZHENG, S.; YAO, B. Impact of risk factors for recurrence after the first ischemic stroke in adults: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 60, p. 24–30, fev. 2019.
- ZHU, H. *et al.* Interleukins and Ischemic Stroke. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 31 jan. 2022.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **26/09/2023**.

Título do projeto	Efeitos do pré-condicionamento imunológico induzido por lipopolissacarídeos em um modelo animal de acidente vascular cerebral isquêmico.
Project title	<i>Effects of lipopolysaccharide-induced immune preconditioning in an animal model of ischemic stroke.</i>
Número do protocolo Protocol number	50/2023 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Fabricia Petronilho
Pesquisadores Researchers	Anita Dal Bó Prudencio da Silva Tiscoski, Carla Damazio Martins, Carlos Henrique Perin, David dos Santos, Fabrício Weinheimer Lippert, Fernanda Frederico Gava, Khiany Mathias, Larissa Joaquim, Lucineia Gainski Danielski, Maiara de Aguiar da Costa, Milena Mazon, Nathalya Camila Cruz Guerra Correa, Richard Simon Machado, Sandra Bonfante, Solange de Souza Stork, Vilson Heinzen Cardoso, Wendel Dietze, Yasmin Ribeiro Strickert, Natália Piacentini da Silva.
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/09/2023 a 03/09/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / <i>Wistar</i>
Idade/Peso	14 dias / 30g
Número de animais	Masculino 110 + Feminino 110 = 220
Procedência	Biotério UNESC

Obs.: retirar as fêmeas e inserir o dobro de machos.

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 26 de setembro de 2023