



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO NEUROREPARADOR DO ÁCIDO DECANOICO EM
MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL**

ANTONIO ÍTALO DOS SANTOS NUNES

GOIÂNIA-GO

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Antonio Ítalo dos Santos Nunes

3. Título do trabalho

EFEITO NEUROREPARADOR DO ÁCIDO DECANÓICO EM MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 16/07/2024, às 02:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Ítalo Dos Santos Nunes, Discendente**, em 17/07/2024, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4671905** e o código CRC **31B65C5F**.

Referência: Processo nº 23070.009273/2024-77

SEI nº 4671905

ANTONIO ÍTALO DOS SANTOS NUNES

**EFEITO NEUROREPARADOR DO ÁCIDO DECANÓICO EM
MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia).

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto

GOIÂNIA-GO

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Nunes, Antonio Ítalo dos Santos
EFEITO NEUROREPARADOR DO ÁCIDO DECANÓICO EM
MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL [manuscrito] / Antonio
Ítalo dos Santos Nunes. - 2024.
76 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2024.

Bibliografia. Apêndice.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, lista de figuras,
lista de tabelas.

1. Acidente vascular. 2. Receptores AMPA. 3. Inflamação. 4.
Autofagia. I. Pinto, Mauro Cunha Xavier, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 568 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Antonio Ítalo dos Santos Nunes** o título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e três dias do mês de fevereiro de 2024, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO DECANOICO EM MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Mauro Cunha Xavier Pinto (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Raphaela Almeida Chiareli (UEG), membro titular externo; Professora Doutora Renata Mazaró e Costa (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição, os membros da banca **sugeriram alteração do título do trabalho**, explicitada abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Mauro Cunha Xavier Pinto, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e três dias do mês de fevereiro de 2024.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

EFEITO NEUROREPARADOR DO ÁCIDO DECANOICO EM MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Cunha Xavier Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 16/07/2024, às 02:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Mazaró E Costa, Professora do Magistério Superior**, em 17/07/2024, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raphaela Almeida Chiareli, Usuário Externo**, em 22/07/2024, às 13:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4671895** e o código CRC **8A0D4AC6**.

Referência: Processo nº 23070.009273/2024-77

SEI nº 4671895

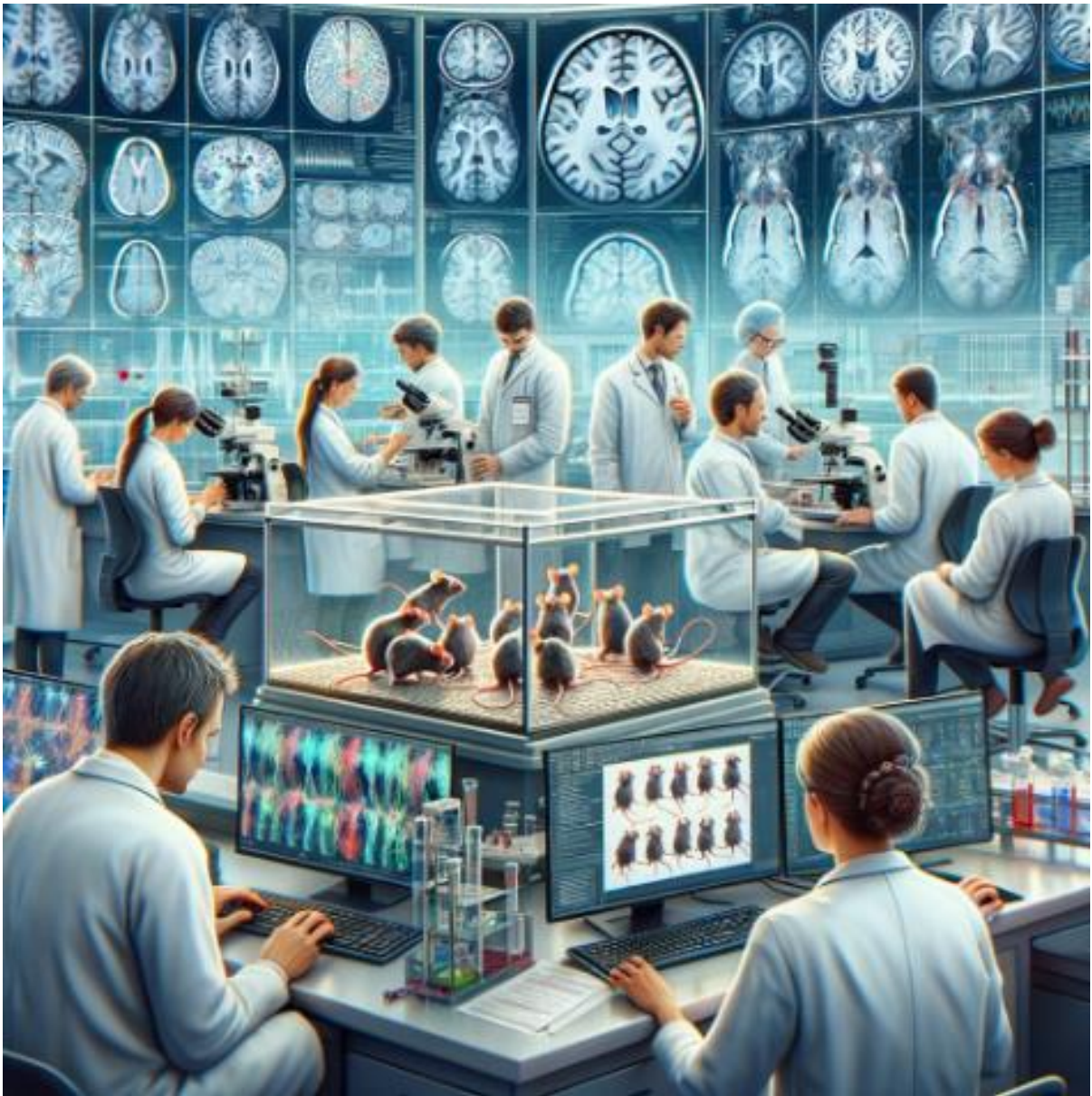
Dedicatória

Pai, dedico esta defesa de mestrado a você.

*Tenho plena consciência de que sempre senti um imenso orgulho de mim e que desejava ardentemente estar presente neste momento tão significativo da minha jornada acadêmica.
Infelizmente, o tempo não permitiu.*

Por isso, dedico esta defesa de mestrado a você, que sempre me apoiou e amou de forma incondicional. Sua falta é sentida todos os dias...

Com amor e gratidão.



“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

Agradecimentos

Gostaria de iniciar, demonstrando minha profunda gratidão a minha família, cujo apoio incondicional tem sido uma fonte constante de força em todos os momentos da minha jornada. À minha mãe, agradeço por seu amor incondicional e proteção constante. Pai, mesmo não estando mais aqui me deixou um legado enorme e agradeço por sempre acreditar em mim e nos meus sonhos. Às minhas irmãs, Camylla, Rudmylla e Rayka, agradeço por serem fontes de risos, lágrimas e muito amor. Vocês são incríveis, e eu os amo profundamente. Obrigado, família, por nunca deixar que me faltasse nada, farei o possível para retribuir cada ato de carinho e apoio.

A meu orientador, Prof. Dr. Mauro Cunha Xavier Pinto, expressei minha gratidão pelo voto de confiança em mim desde o início. Agradeço pelos ensinamentos, paciência e confiança durante o desenvolvimento da pesquisa. Sua disposição para auxiliar e esclarecer dúvidas ao longo dessa jornada me deixa com a sensação de dever cumprido ao seguir para novas etapas da minha vida acadêmica.

Aos colegas de laboratório, Neurolab, em especial ao pessoal da pós-graduação Eduardo, Daniel, Raphaela, Gustavo, Raul e o Joao Elias, minha gratidão por sua ajuda, apoio e ensinamentos que contribuíram significativamente para o meu crescimento. E o pessoal de IC, Paul, Camilly, Bruna, Malu, Amanda, Malu e Lucas obrigado por tudo.

A minha amiga e companheira fiel desde que cheguei nesse Goiás, Rebeca Amorim, por sempre me apoiar e acreditar em mim, te amo muito e vou carregar você comigo pro resto da vida.

Aos meus amigos da UFT, que mesmo de longe estão sempre me apoiando e me motivando, não vou citar nomes, pois se for para colocar o nome de todos não vai caber nesta dissertação, por isso sintam-se imensamente agradecidos!

Um enorme agradecimento à Fundação Universidade Federal do Goiás e todo seu corpo docente por me proporcionarem experiência e um grande aprendizado durante todo o curso. E aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPEG e FAPMIG pelo suporte financeiro concedido, que viabilizou a realização deste trabalho de pesquisa. O apoio dessas instituições foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo e para a minha estadia aqui no Goiás, imensamente grato pela oportunidade concedida.

Sumário

1.	Impacto e Relevância da Pesquisa para Sociedade.....	17
2.	Justificativa	18
3.	Introdução.....	19
	3.1 Acidente Vascular Encefálico (AVE).....	19
	3.2 Isquemia cerebral	21
	3.3 Excitotoxicidade e os receptores AMPA.....	24
	3.4 A autofagia e isquemia cerebral	26
	3.5 Ácido Decanoico e dieta cetogênica.....	29
4.	Objetivos	31
	4.1. Objetivo Geral.....	31
	4.2. Objetivos específicos.....	31
5.	Material e Métodos.....	32
	5.1 Fármaco	32
	5.2 Animais experimentais.....	32
	5.3 Desenho experimental.....	32
	5.4 Modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO).....	33
	5.5 Avaliação morfológica.....	34
	5.6 Avaliação motora dos animais.....	34
	5.6.1 Teste do Cilindro	34
	5.6.2 Teste de <i>Limb Clasp</i> ing.....	35
	5.7 Avaliação da memória dos animais	36
	5.7.1 Teste campo aberto	36
	5.7.2 Teste de Localização do Objeto (OLT)	37
	5.7.3 Teste de reconhecimento do novo objeto (NORT)	38
	5.8 Análises Bioquímicas.....	39
	5.8.1 Determinação de biomarcadores inflamatórios por ELISA.....	39
	5.8.2 Avaliação da dinâmica de proteína no córtex por Western blot	40

5.9 Análise estatística.....	41
6. Resultados	42
6.1 Ácido decanoico promove uma diminuição na área da isquemia em modelo animal de isquemia cerebral	42
6.2 Ácido decanoico promove uma melhora no score neurológico no teste de <i>Limb Clasp</i>	44
6.3 Ácido decanoico promove uma melhora nos déficits motores no teste do cilindro	45
6.4 Ácido decanoico não promove alteração no comportamento motor no teste de campo aberto	46
6.5 Ácido decanoico promove uma melhora na memória espacial no teste de localização do objeto	48
6.6 Ácido decanoico promove uma melhora a memória contextual no teste de reconhecimento do novo objeto	49
6.7 Ácido decanoico promove diminuição em biomarcadores pro inflamatórios no córtex em modelo animal de isquêmica cerebral.....	51
6.8 Ácido decanoico na expressão de AMPAR no modelo de MCAO ..	52
6.9 Ácido decanoico na expressão de proteínas associadas à autofagia no modelo de MCAO	53
7. Discussão.....	59
8. Conclusão	66
REFERÊNCIAS.....	67
APENDECE I.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcAc – Acetoacetato

ACC - Artéria carótida comum

ACM - Artéria cerebral média

AGCM - Ácidos graxos de cadeia média

AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato

AMPK - Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

Atg – Genes de autofagia

ATP - Adenosina Trifosfato

AVC - Acidente Vascular Cerebral

AVE - Acidente Vascular Encefálico

BCCAO - Oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (do inglês “*bilateral of the common carotid arteries occlusion*”)

Beclin-1 - Atg6

BHB - Beta-hidroxibutirato

CAT - Catalase

DC - Dieta cetogênica

DCiF/DFAR - Departamentos de Ciências Fisiológicas e Departamento de Farmacologia

GluT - Transportador de glutamato

GPX - Glutathione Peroxidase

I/R – Isquemia e reperfusão

ID – Índice de discriminação

IP – Intraperitoneal

LC3 – proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos

MCAO - Oclusão de artéria cerebral média (do inglês “*Medial Cerebral Artery Occlusion*”)

mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NMDA - N-Metil-D-Aspartato

NORT – Teste reconhecimento de um novo objeto (do inglês “*Test recognition of a new object*”)

OLT – Teste de localização do objeto (do inglês “*Object Location Test*”)

p62 - SQSTM1

PE – fosfatidiletanolamina

PKC - Proteína quinase C (do inglês “*Protein kinase C*”)

rTPA - Ativador de Plasminogênio Tecidual (do inglês “*Recombinant Recombinant Tissue Plasminogen Activator*”)

SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade

SNC - Sistema Nervoso Central

TCM - Triglicerídeos de cadeia média

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TTC - Cloreto de 5-trifenil-2H-tetrazólio

ULK1 - Unc-51

VO – Via oral

Vps34 – Proteína Vacuolar 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da cascata de eventos celulares relacionados com a fisiopatologia da isquemia cerebral.....	22
Figura 2. Processo de excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos.	26
Figura 3. Caminho da autofagia. Uma visão geral esquemática da via autofágica e das principais proteínas e reguladores.	27
Figura 4. Diagrama esquemático demonstrando o delineamento experimental.....	33
Figura 5. Representação do teste do cilindro. N	35
Figura 6. Representação do teste do limb clasping.	36
Figura 7. Representando o teste do campo aberto.	37
Figura 8. Representação do teste de localização do objeto.	38
Figura 9. Representação do teste de reconhecimento do novo objeto.....	39
Figura 10. Ácido decanoico promove uma diminuição na área da isquemia em modelo animal de isquemia cerebra após 7 dia de tratamento.	43
Figura 11. Efeito do Ácido decanoico promove uma melhora no score neurológico no teste de Limb Clasping.	44
Figura 12. Efeito Ácido decanoico promove uma melhora nos difíceis motores no teste do cilindro ..	46
Figura 13. Ácido decanoico não promove alteração no comportamento motor no teste de campo aberto.....	47
Figura 14. Ácido decanoico promove uma melhora na memória espacial no teste de localização do objeto durante 7 e 14 dias de tratamento.....	49
Figura 15. Ácido decanoico promove uma melhora a memória contextual no teste de reconhecimento do novo objeto.....	50
Figura 16. Quantificação da concentração de proteínas pro inflamatórias, após 7 dias de tratamento com ácido decanoico.	52
Figura 17. Quantificação da concentração de proteínas envolvidas nas subunidades do receptor AMPA, após 7 dias de tratamento com ácido decanoico.	52
Figura 18. Quantificação da concentração de proteínas envolvidas nas subunidades do receptor AMPA, após 14 dias de tratamento com ácido decanoico.	53
Figura 19. Quantificação da concentração de proteínas envolvidas na via do mTOR e via da autofagia, após 7 dias de tratamento com ácido decanoico.	56
Figura 20. Quantificação da concentração de proteínas envolvidas na via do mTOR e via da autofagia, após 14 dias de tratamento com ácido decanoico.	58

RESUMO

A isquemia cerebral é um distúrbio neurológico que ocorre devido à interrupção abrupta do fluxo sanguíneo no cérebro e pode resultar em danos cognitivos e motores. O ácido decanoico tem sido proposto como um potencial agente terapêutico em doenças neurológicas, pois bloqueia os receptores AMPA e atua na neuroinflamação. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do ácido decanoico em modelo de isquemia cerebral por oclusão da artéria cerebral média (MCAO) em camundongos. Para isso, os camundongos receberam diferentes doses do ácido decanoico (62,5, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg) ou veículo por gavagem durante 7 ou 14 dias após a indução da isquemia. A análise morfológica da área isquêmica foi realizada pela coloração de TTC. Foram também avaliados a assimetria motora, o tônus postural, o déficit de memória espacial e contextual utilizando os testes do Cilindro, *Limb Clasp*ing, OLT e NORT respectivamente. Além disso, foram realizadas investigações dos mecanismos envolvidos nesse neurorreparo pela técnica de ELISA para biomarcadores inflamatórios e *Western Blot* para analisar vias dos receptores AMPA e autofagia. Os resultados mostraram que, após 7 e 14 dias de tratamento, o ácido decanoico foi capaz de promover efeitos neuroreparadores, evidenciados pela diminuição da área isquêmica e pela melhora nos prejuízos motores, cognitivos e memória. Além de revelar efeitos anti-inflamatórios, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e surpreendentemente, esse efeito parece não estar relacionado a alterações na expressão de receptores AMPA nem na via de autofagia. Este estudo sugere que o ácido decanoico possui potencial terapêutico para lesões isquêmicas, promovendo a recuperação funcional e cognitiva, além de atuar na redução da inflamação.

Palavras-Chave: Acidente vascular; receptores AMPA; inflamação; autofagia.

ABSTRACT

Cerebral ischemia is a neurological disorder that occurs due to the abrupt interruption of blood flow in the brain and can result in cognitive and motor impairments. Decanoic acid has been proposed as a potential therapeutic agent in neurological diseases as it blocks AMPA receptors and acts on neuroinflammation. In this context, the aim of this study was to investigate the effect of decanoic acid in a model of cerebral ischemia by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in mice. For this purpose, mice received different doses of decanoic acid (62.5, 125, 250, 500, and 1000 mg/kg) or vehicle by gavage for 7 or 14 days after the induction of ischemia. Morphological analysis of the ischemic area was performed by TTC staining. Motor asymmetry, postural tone, spatial and contextual memory deficits were also evaluated using the Cylinder, Limb Clasp, OLT, and NORT tests, respectively. Furthermore, investigations of the mechanisms involved in this neurorepair were carried out by ELISA technique for inflammatory biomarkers and Western Blot to analyze AMPA receptor pathways and autophagy. The results showed that, after 7 and 14 days of treatment, decanoic acid was able to promote neurorepair effects, evidenced by the reduction of the ischemic area and improvement in motor, cognitive, and memory impairments. In addition to revealing anti-inflammatory effects, reducing the expression of pro-inflammatory cytokines, and surprisingly, this effect seems not to be related to changes in the expression of AMPA receptors or the autophagy pathway. This study suggests that decanoic acid has therapeutic potential for ischemic injuries, promoting functional and cognitive recovery, as well as acting on reducing inflammation.

Key words: Stroke; AMPA receptors; inflammation; autophagy.

1. Impacto e Relevância da Pesquisa para Sociedade

A pesquisa sobre os efeitos terapêuticos do ácido decanoico em modelos de isquemia cerebral lança uma luz promissora sobre novas abordagens para o tratamento de condições neurológicas severas, tais como acidentes vasculares cerebrais (AVC) e outras formas de lesões cerebrais isquêmicas. Os achados desta investigação não apenas avançam nosso entendimento científico sobre as potencialidades de compostos bioativos na neuroproteção e reparo, mas também sinalizam possíveis caminhos para intervenções terapêuticas mais eficazes na recuperação pós-isquêmica, com um impacto profundo e relevante para a sociedade.

A redução significativa da área isquêmica e o aprimoramento nas funções cognitivas e motoras observados com a administração de ácido decanoico indicam uma estratégia potencialmente eficaz para mitigar os efeitos devastadores de eventos isquêmicos no cérebro. Estas descobertas têm implicações diretas para o desenvolvimento de terapias destinadas a melhorar a qualidade de vida de pacientes que sofreram AVCs ou lesões cerebrais similares, oferecendo esperança para uma recuperação mais completa e rápida.

O impacto social e econômico das descobertas também é notável. As condições isquêmicas cerebrais representam uma das principais causas de mortalidade e incapacidade em todo o mundo, acarretando significativos ônus para os sistemas de saúde, famílias e a sociedade como um todo. Ao proporcionar uma base para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e menos invasivos, esta pesquisa pode contribuir para a redução da carga associada a essas condições, melhorando os resultados clínicos para os pacientes e diminuindo os custos relacionados à assistência médica e ao suporte de longo prazo.

Por fim, os resultados deste estudo não apenas ampliam nosso conhecimento sobre as possibilidades terapêuticas no contexto do dano cerebral isquêmico, mas também enfatizam a importância da pesquisa contínua em neurociência e farmacologia. O avanço nesse campo pode abrir novos horizontes para tratamentos que restauram a função neural e melhoram a vida de indivíduos afetados por doenças neurológicas, representando um passo significativo em direção ao alívio do impacto global das lesões cerebrais isquêmicas.

2. Justificativa

Anualmente, estima-se que aproximadamente 17 milhões de indivíduos sejam impactados por Acidente Vascular Encefálico (AVE) em escala global. Dessa população, um terço não sobrevive, enquanto os sobreviventes frequentemente sofrem de sequelas neurológicas permanentes, incluindo prejuízos de memória e dificuldades motoras que comprometem a habilidade de caminhar e executar movimentos precisos. Tais sequelas comprometem substancialmente a qualidade de vida dos indivíduos afetados. De fato, as patologias cerebrovasculares figuram entre as principais causas de óbito no Brasil (2, 3).

No que tange ao tratamento do AVE isquêmico, as opções farmacológicas eficazes são limitadas. A alteplase, uma terapia trombolítica que emprega rtPA (actilyse), é aplicada em cenários agudos, embora esteja associada a riscos de hemorragia e seja circunscrita por critérios de exclusão rigorosos. A tenecteplase (metalyse), um medicamento análogo ao rtPA, demonstra eficácia no tratamento do AVE isquêmico, porém compartilha dos mesmos riscos. As estratégias preventivas que utilizam antiagregantes, como o ácido acetilsalicílico (aspirina), são limitadas devido aos efeitos colaterais, incluindo irritação gástrica e risco aumentado de hemorragias gastrointestinais. Portanto, novas abordagens farmacológicas que almejem alvos terapêuticos inovadores para a proteção e reparação neuronal são bem-vindas no contexto do tratamento do AVE isquêmico.

Recentemente, um estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa focou na análise de alterações lipídicas cerebrais durante isquemia crônica, visando identificar biomarcadores e novos alvos terapêuticos para o tratamento de demência vascular (4). Observou-se um aumento na concentração de ácido decanoico em um modelo experimental de isquemia cerebral, evidenciando seu possível potencial na neuroplasticidade sináptica, indicando assim, como biomarcador e alvo farmacológico para demência vascular (4). Este achado é de grande relevância, considerando a busca por novas moléculas capazes de mitigar o processo de excitotoxicidade cerebral e fomentar a proteção neuronal, representando um avanço significativo para a saúde pública.

Dessa forma, o presente estudo empreendeu uma avaliação do potencial neuroreparador do ácido decanoico em modelos animais que replicam as condições de um AVE isquêmico. A investigação concentrou-se no impacto do ácido decanoico sobre

os receptores AMPA e nos processos inflamatório e autofágico, visando elucidar sua eficácia terapêutica potencial.

3. Introdução

3.1 Acidente Vascular Encefálico (AVE)

O acidente vascular encefálico (AVE), também conhecido como acidente vascular cerebral (AVC) ou derrame cerebral é uma condição caracterizada por uma interrupção do fluxo sanguíneo para parte do cérebro, resultando em danos ao tecido cerebral. Existem dois tipos principais de AVC: o isquêmico e o hemorrágico. O AVC isquêmico é o tipo mais comum e ocorre quando um vaso sanguíneo que fornece sangue ao cérebro é bloqueado por um coágulo sanguíneo ou placa aterosclerótica. Isso impede o fornecimento adequado de oxigênio e nutrientes para as células cerebrais, levando a danos celulares e morte. Por outro lado, um AVC hemorrágico ocorre quando há sangramento no cérebro devido ao rompimento de um vaso sanguíneo. Isso pode ser causado por fraqueza nas paredes dos vasos (aneurisma) ou pressão alta descontrolada (hipertensão) (2, 5).

O AVE é uma condição médica grave e pode levar a complicações graves e à morte. As taxas de mortalidade variam dependendo da gravidade do AVE, da idade do paciente e de outros fatores. Estima-se que aproximadamente 17 milhões de casos ocorram anualmente em todo o mundo. Sendo é uma das principais causas de morte em adultos e incapacidade neurológica grave em todo o mundo. Essas consequências podem se manifestar como comprometimento cognitivo, incluindo problemas de memória e dificuldades motoras, como distúrbios da marcha e perda do controle motor fino. Com isso, têm um impacto negativo na qualidade de vida dos sobreviventes, afetando as suas atividades diárias e a sua independência (2, 3).

No Brasil, as doenças cerebrovasculares, incluindo o AVE, são uma das principais causas de mortalidade. Em 2020, de acordo com o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde - DATASUS, foram registrados 99.010 óbitos por AVE no Brasil, incluindo infarto cerebral, AVC isquêmico, AVC hemorrágico, hemorragia subaracnóidea e AVC não especificado como isquêmico ou hemorrágico (6). É importante ressaltar que há diferença de prevalência entre os sexos, sendo mais comum em homens do que em mulheres. O tratamento precoce e a reabilitação são essenciais para minimizar as consequências e promover a recuperação funcional após o AVE. O

tratamento pode incluir medicamentos para dissolver coágulos sanguíneos, cirurgia para reparar vasos sanguíneos danificados, reabilitação física, terapia ocupacional, fonoaudiologia e apoio psicossocial (7, 8).

Os sintomas do AVE podem variar dependendo da área específica do cérebro afetada e da gravidade da lesão. Os sintomas mais comuns incluem fraqueza ou paralisia unilateral, dificuldade para falar e na compreensão, distúrbios visuais, tontura, problemas de equilíbrio e coordenação, dores de cabeça repentinas e intensas e confusão mental. Reconhecer esses sintomas e procurar ajuda médica rapidamente é essencial, pois o tratamento precoce pode desempenhar um papel vital para minimizar os danos cerebrais e melhorar o prognóstico geral (6, 9).

Mais estudos e pesquisas científicas são essenciais para aprofundar o conhecimento sobre o AVE, entender suas causas, fatores de risco, mecanismos de lesão cerebral e desenvolver novas abordagens terapêuticas. Dentro desse contexto, uma ampla gama de pesquisas está sendo conduzida a área de neuroreparo e neuroproteção. O conceito de neuroreparo abarca uma série de processos e intervenções destinados a facilitar a recuperação do sistema nervoso após uma lesão. Essas estratégias visam promover a regeneração ou reparo do tecido neural danificado, envolvendo mecanismos como neurogênese, sinaptogênese, remielinização axonal e reorganização funcional do cérebro. O principal objetivo do neuroreparo é restaurar, na medida do possível, a função perdida devido à lesão (10-12).

Por sua vez, a neuroproteção refere-se a um conjunto de estratégias e intervenções destinadas a preservar o tecido neural e evitar a morte de neurônios e outras células do sistema nervoso após um evento lesivo, como um AVE ou trauma. O objetivo é proteger as células nervosas dos processos patológicos desencadeados pela lesão, tais como excitotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo, com o intuito de minimizar os danos e preservar a função neurológica (10, 11). Essas pesquisas estão sendo conduzida em todo o mundo para melhorar a prevenção, diagnóstico e tratamento do AVE, visando reduzir as taxas de mortalidade e morbidade associadas a essa condição.

3.2 Isquemia cerebral

A patogênese da isquemia cerebral é caracterizada pela redução do fluxo sanguíneo focal ou global, que leva a diminuição significativa no suprimento de oxigênio e glicose para o sistema nervoso central (SNC). Que resulta em colapso energético, desencadeando a morte celular (13-15). Como uma estratégia de sobrevivência, as células na área afetada pela isquemia cerebral iniciam o processo de glicólise anaeróbica como uma fonte alternativa de energia. No entanto, a quantidade de energia obtida por meio dessa via anaeróbica é insuficiente para manter a sobrevivência neuronal de forma adequada (13, 15, 16). Consequentemente, a gravidade da lesão cerebral está relacionada à duração e à extensão do evento de isquemia (15-17).

A interrupção do suprimento de oxigênio e glicose para o cérebro desencadeia uma série de eventos que resultam em danos celulares e disfunção cerebral. Esses eventos estão relacionados à alteração do metabolismo energético da célula, à desregulação das bombas iônicas, neuroinflamação, sobrecarga de cálcio, excitotoxicidade, estresse oxidativo, apoptose e autofagia (Figura 1) (1, 13, 18). Como resposta, as células cerebrais começam a utilizar a glicólise anaeróbica como fonte de energia. Durante esse processo, a glicose é convertida em lactato para a produção de adenosina trifosfato (ATP) sem a presença de oxigênio. No entanto, a glicólise anaeróbica produz quantidades insuficientes de ATP para sustentar a função neuronal adequada, resultando em uma deficiência grave de ATP, e gerando um aumento expressivo na acidose tecidual que gera sinalização necessária para a morte celular. Com essa diminuição significativa na produção de adenosina trifosfato (ATP), que é a principal fonte de energia celular, afeta diretamente a função das bombas iônicas, especialmente as bombas de sódio/potássio (Na^+/K^+), que são responsáveis pelo equilíbrio osmótico e elétrico da membrana plasmática das células cerebrais. A queda na atividade dessas bombas leva a um desequilíbrio iônico, com um aumento dos íons de cálcio (Ca^{+2}) e sódio (Na^+) no meio intracelular e um aumento dos íons de potássio (K^+) no meio extracelular (19, 20).

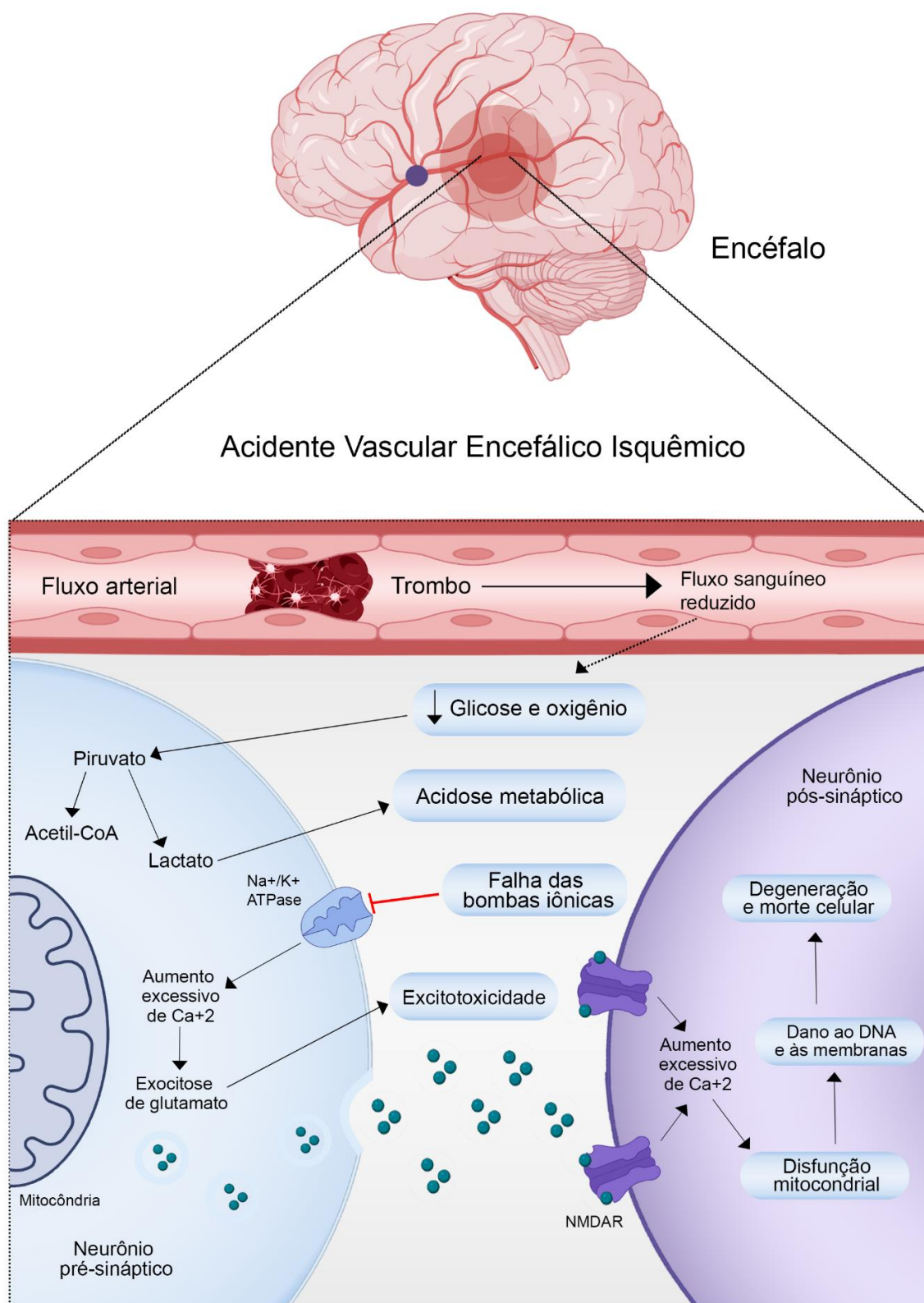


Figura 1. **Representação esquemática da cascata de eventos celulares relacionados com a fisiopatologia da isquemia cerebral.** Nessa imagem destaca-se como a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral causa uma drástica diminuição do aporte de oxigênio e glicose, o que por sua vez modifica o metabolismo celular para a produção anaeróbica de lactato e consequente geração de acidose metabólica. Além disso, ocorre a falha das bombas iônicas, que promovem um aumento da concentração intracelular de cálcio e a exocitose massiva de glutamato. Esse glutamato por sua vez hiperativa receptores NMDA, que geram um alto influxo de cálcio no neurônio pós-sináptico, que em última instância sofre disfunção mitocondrial, dano ao DNA e membranas e morte celular. Fonte: (1)

Este desequilíbrio iônico, em grande parte, favorece o aumento do influxo de íons cálcio (Ca^{+2}), que provoca uma liberação desmedida de neurotransmissores, principalmente o glutamato. O glutamato, um neurotransmissor excitatório, tem papel fundamental na transmissão sináptica. Isso resulta em uma superestimulação de seus receptores pós-sinápticos, como os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) e Cainato, levando à excitotoxicidade. A excitotoxicidade, caracterizada pela hiperexcitação neuronal, inicia uma série de eventos danosos. Entre eles estão a ativação de enzimas que prejudicam as estruturas celulares, a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e, eventualmente, a morte celular (13, 17-19, 21). Este estado leva à ativação de rotas de estresse celular que produzem quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^\cdot). Essas espécies reativas de oxigênio (EROs) são compostos altamente reativos formados a partir de reduções sucessivas do oxigênio, como regulação do crescimento celular, produção de energia e fagocitose; porém induzem a peroxidação lipídica e causam danos em enzimas, proteínas, carboidratos e DNA, quando em concentrações elevadas (22, 23). Para combater esse efeito, enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase são essenciais, pois neutralizam essas espécies reativas de oxigênio, convertendo-as em moléculas menos tóxicas. No entanto, em casos de isquemia cerebral grave, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio ultrapassa os mecanismos de defesa antioxidante das células. Isso resulta em danos celulares progressivos e cada vez mais severos (18, 24, 25).

Concomitante a isso, vem sendo desencadeada uma sequência complexa de eventos que resultam na ativação de células inflamatórias, como a microglia e astrócitos, as quais liberam citocinas e quimiocinas, promovendo a infiltração de leucócitos na região isquêmica (25-27). As citocinas, reconhecidas como agentes imunomoduladores, desempenham papel crucial na ativação, proliferação e diferenciação celular após lesão cerebral isquêmica (28). A expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias é regulada positivamente após a lesão cerebral, sendo a regulação espacial e temporal fortemente dependente do modelo isquêmico utilizado (29, 30). Entre as citocinas pró-inflamatórias predominantes destacam-se a interleucina 1β (IL- 1β), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), desencadeando e intensificando a resposta inflamatória após o evento vascular (31, 32). Em contrapartida, para mitigar esses efeitos, destacam-

se o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e a IL-10, sendo citocinas anti-inflamatórias que inibem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, resultando na redução da inflamação (33, 34). Tais agentes pró e anti-inflamatórios contribuem para danos e reparos cerebrais, sendo o equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais dessas citocinas fortemente influenciado pelo estado bioquímico e fisiológico do cérebro (25).

3.3 Excitotoxicidade e os receptores AMPA

A fisiopatologia da isquemia cerebral está intimamente relacionada ao fenômeno de excitotoxicidade, que envolve a liberação excessiva de aminoácidos excitatórios, especialmente o glutamato. Essa teoria propõe que, durante a isquemia cerebral, ocorre uma ativação desregulada de receptores de glutamato como AMPA, NMDA e cainato, além dos receptores metabotrópicos que se acoplam às proteínas G resultando em um influxo excessivo de cálcio intracelular, que vai ocasionar uma série de eventos que resultam em danos celulares e morte (35, 36). A interrupção dos gradientes eletroquímicos que ocorre na excitotoxicidade das membranas neuronais afeta o funcionamento dos transportadores de glutamato, como o transportador de glutamato (GluT). A disfunção do GluT leva à redução da recaptção do glutamato, aumentando sua concentração na fenda sináptica, perpetuando uma cascata de atividade excitotóxica nas células neuronais adjacentes (37).

Os receptores AMPA desempenham um papel essencial na transmissão eficiente de sinais excitatórios no sistema nervoso central. Os receptores AMPA são compostos por várias subunidades que influenciam suas propriedades funcionais e farmacológicas. As quatro principais subunidades conhecidas são GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4. Estas subunidades são codificadas por genes específicos (GRIA1, GRIA2, GRIA3 e GRIA4, respectivamente) e se combinam de várias maneiras para formar receptores funcionais (38, 39).

A subunidade GluA1 está fortemente implicada em processos de plasticidade sináptica, como a potenciação de longo prazo (LTP), que é essencial para a aprendizagem e memória. Estudos indicam que receptores contendo GluA1 são frequentemente encontrados em sinapses em desenvolvimento e em regiões do cérebro envolvidas em processos de plasticidade (38, 40, 41). Por sua vez, a subunidade GluA2 é única entre as subunidades AMPA devido à sua capacidade de sofrer edição de RNA. Essa edição

resulta em uma alteração na sequência de aminoácidos da proteína, afetando a função dos receptores. A presença da subunidade GluA2 modula a permeabilidade dos receptores AMPA ao íon cálcio, desempenhando um papel crucial na regulação da excitotoxicidade, um processo que pode levar à morte celular em condições patológicas (42, 43). As subunidades GluA3 e GluA4 também contribuem para a diversidade funcional dos receptores AMPA, embora seu papel específico ainda não seja totalmente compreendido. No entanto, estudos sugerem que elas desempenham papéis importantes na plasticidade sináptica e na regulação da função neural (44, 45).

A diversidade funcional dos receptores AMPA mediados pelas diferentes combinações de subunidades permite uma regulação fina da transmissão sináptica e da plasticidade neural em diferentes contextos fisiológicos e patológicos. Alterações na expressão ou função das subunidades AMPA foram associadas a várias condições neurológicas, incluindo epilepsia, doença de Alzheimer e isquemia cerebral (46-50).

Durante eventos de isquemia cerebral, há um aumento significativo na expressão dos receptores AMPA, resultando em uma maior permeabilidade desses canais iônicos. Esses receptores são receptores ionotrópicos ligados à canais de Na^+ e Ca^{2+} , permitindo um maior influxo desses íons (51). A despolarização inicial que desencadeia a ativação dos receptores NMDA é frequentemente causada pela rápida despolarização induzida pela ativação dos receptores de glutamato AMPA e cainato. Após a ativação dos receptores AMPA, o glutamato ativa os receptores NMDA, resultando em um influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) e desencadeando cascata de sinalização envolvendo proteína quinase C (PKC) e ativação do complexo cálcio-calmodulina (21, 52, 53). A ativação dos receptores AMPA e NMDA está interconectada, mas eles são distintos. A ativação dos receptores AMPA pode levar à ativação dos receptores NMDA, e ambos desempenham papéis importantes na regulação da função cerebral. Bloquear os receptores AMPA pode ser uma estratégia para atenuar a excitotoxicidade ao diminuir a ativação subsequente dos receptores NMDA (37, 54, 55).

Existem evidências sólidas que indicam que os receptores AMPA desempenham papel fundamental na neurodegeneração após um evento de isquemia cerebral. Essas evidências são derivadas de estudos que investigam os efeitos protetores dos antagonistas dos receptores AMPA contra a morte neuronal induzida pela isquemia. Esses estudos

forneem indicações de um papel fisiológico dos receptores AMPA na neurodegeneração pós-isquêmica (54-57).

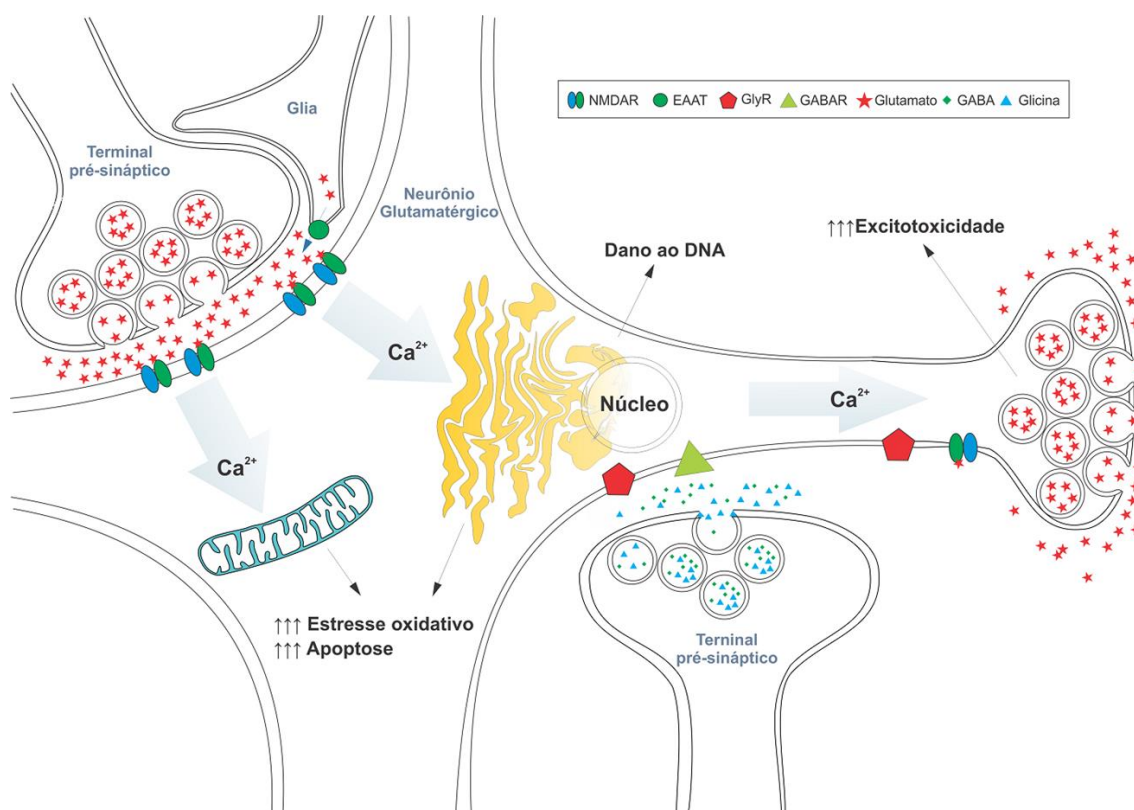


Figura 2. **Processo de excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos.** Durante a cascata excitotóxica, a liberação exacerbada de glutamato gera um grande influxo de Ca^{2+} através do receptor NMDA. O aumento exacerbado de Ca^{2+} dentro da célula gera acúmulo na mitocôndria, o que pode desencadear aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e levar as células à morte por apoptose. A estimulação exacerbada destes neurônios também desencadeia a excitotoxicidade de mais neurotransmissores, que por sua vez, ampliam o fenômeno de excitotoxicidade. Fonte: (58)

3.4 A autofagia e isquemia cerebral

Na isquemia, devido à privação de oxigênio e glicose, ocorre uma série de eventos moleculares e celulares, destacando a estimulação da autofagia que é um mecanismo celular conservado que atua na degradação e reciclagem de componentes celulares danificados ou desnecessários. Durante a autofagia, as células formam vesículas membranosas chamadas autofagossomos que se fundem com o lisossomo e formando o autofagolisossomo, que englobam os materiais celulares alvos e fazem a digestão e internalização, sendo esse processo regulado por várias vias metabólicas e denominado como fluxo autofágico. Esse processo desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase celular, removendo proteínas malformadas, organelas danificadas e agregados proteicos (59, 60), (Figura 03).

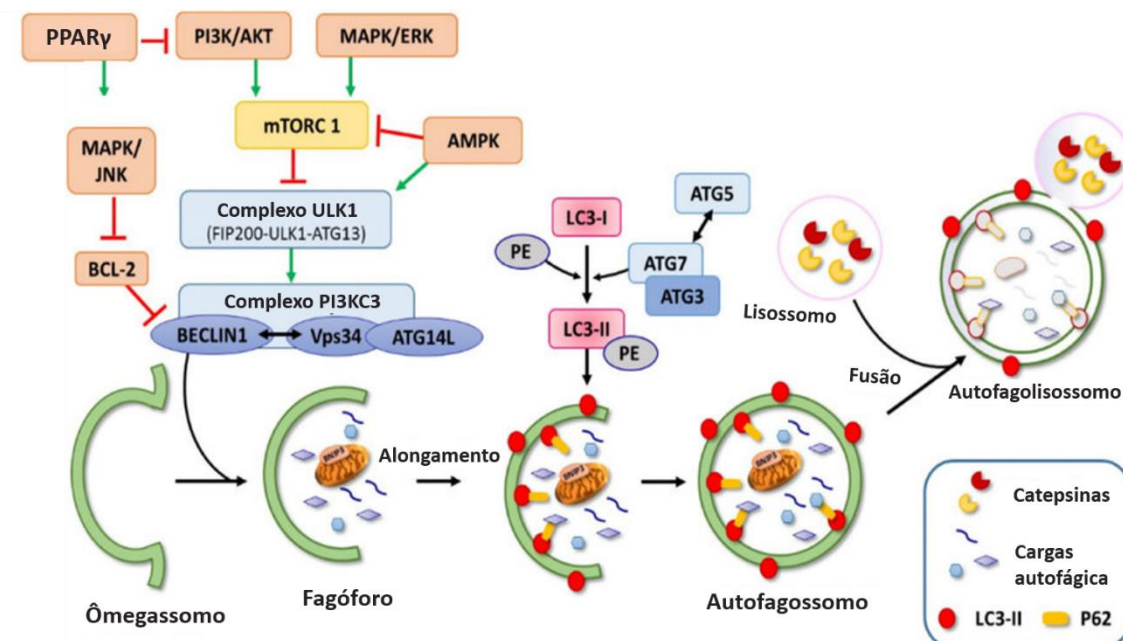


Figura 3. Caminho da autofagia. Uma visão geral esquemática da via autofágica e das principais proteínas e reguladores: a imagem mostra as três etapas desde a formação do fagóforo, alongamento e maturação do autofagossomo, até a fusão autofagolisossoma. Para detalhes consulte o texto. ATG: gene ou proteína relacionada à autofagia. →: ativação ou indução; ⊥: inibição; ↔: interação. Fonte: adaptado de (61).

Na isquemia cerebral, a autofagia pode ser ativada como uma resposta adaptativa às condições de estresse. Esse fenômeno é influenciado tanto positivamente quanto negativamente por vias intracelulares. A proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) desempenha um papel essencial como sensor de energia, mantendo a homeostase metabólica e um iniciador do processo de autofagia. O alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma quinase conservada, que desempenha um papel na regulação do crescimento celular e também na inibição do processo de autofagia (62-64). Estudos mostraram que a interação entre AMPK e mTOR é crucial na regulação da autofagia induzida pela isquemia global, mediada pela fosforilação coordenada da quinase 1 semelhante a Unc-51 (ULK1). A AMPK fosforila ULK1 em Ser317, promovendo a autofagia, enquanto o mTOR suprime a atividade de AMPK, aumentando a fosforilação de ULK1 em Ser757 (65-67).

Para iniciar a autofagia é necessário a ativação do complexo ULK1, em seguida, ocorre a formação do fagossomo, onde a proteína Beclin-1 (Atg6) desempenha um papel essencial. Beclin-1 forma um complexo com a enzima fosfatidilinositol 3-quinase classe III (Vps34), iniciando a nucleação do fagossomo (68). Durante o processo de alongamento e maturação do fagossomo, a proteína LC3 (cadeia leve 3 associada a microtúbulos) desempenha um papel crucial. A LC3 é conjugada com fosfatidiletanolamina (PE) para formar a forma lipídica LC3-II, que é recrutada para a

membrana do fagossomo e facilita sua expansão (69, 70). É crucial compreender que a via autofágica, mediada por proteínas essenciais como a p62 (também conhecida como SQSTM1), desempenha um papel crucial na eliminação de substratos marcados para degradação. A p62 atua como um adaptador, reconhecendo e se ligando aos substratos autofágicos marcados para degradação. Essa interação é particularmente significativa na interação da p62 com a proteína LC3-II, presente na membrana do autofagossomo. Essa interação entre p62 e LC3-II facilita a entrega eficiente dos substratos marcados para degradação no lisossomo, onde ocorre a subsequente degradação. Esses mecanismos precisos desempenham um papel fundamental na regulação e execução do processo autofágico, contribuindo para a manutenção da homeostase celular e eliminação de componentes celulares danificados ou desnecessários (71).

Esses processos moleculares que regulam a autofagia são altamente complexos e multifacetados. Em estágios iniciais, a autofagia pode ajudar as células neurais a sobreviverem ao estresse isquêmico, removendo componentes celulares danificados e mantendo a integridade celular. No entanto, em condições de estresse prolongado ou severo, a autofagia pode se tornar excessiva ou disfuncional, contribuindo para a morte celular por apoptose autofágica ou necrose.

Conforme mostrado em diversos estudos, o papel da autofagia ainda se encontra controverso na isquemia cerebral. Alguns estudos realizados em ratos com isquemia, a administração de substâncias inibidoras da autofagia como 3-metiladenina, hidrossulfeto de sódio, bafilomicina A1 e carnosina (Inibidora ou estimuladora) resultou na inibição clara da autofagia neuronal, levou a uma redução no tamanho da lesão e melhorou função mitocondrial (72-74). Por outro lado, outros estudos sugeriram que a autofagia desempenha um papel protetor na isquemia cerebral como o tratamento com 3-MA um estimulador da via autofágica 30 minutos antes da isquemia cerebral aumentou significativamente a morte celular neuronal e promoveu a expressão de caspase-3 clivada (75). Assim como a rapamicina um ativador da via autofágica para induzir a autofagia resultou em uma diminuição evidente no tamanho da lesão e nos escores neurológicos em diferentes modelos de isquemia cerebral (76).

Portanto, futuras pesquisas são necessárias para compreensão mais aprofundada dos mecanismos regulatórios da autofagia e de como eles podem ser modulados e desenvolver estratégias terapêuticas direcionadas para aproveitar seu potencial.

3.5 Ácido Decanoico e dieta cetogênica

A dieta cetogênica (DC) é um plano alimentar caracterizado por um consumo muito baixo de carboidratos, moderado em proteínas e alto em gorduras saudáveis. Essa abordagem nutricional tem sido amplamente estudada e utilizada para diferentes fins, incluindo a neuroreparação e neuroproteção. Os ácidos graxos presentes na DC desempenham um papel fundamental na obtenção de energia e na promoção de diversos benefícios para a saúde. O consumo adequado de ácidos graxos monoinsaturados, saturados e poli-insaturados, especialmente ômega-3, pode contribuir para a eficácia e segurança dessa abordagem nutricional (77-79).

A DC de triglicerídeos de cadeia média (TCM) é uma forma modificada da DC clássica que tem sido estudada e utilizada em diversos contextos clínicos. Essa abordagem dietética é caracterizada pelo consumo de triglicerídeos de cadeia média, que são ácidos graxos com uma estrutura molecular mais curta em comparação com os ácidos graxos de cadeia longa encontrados em fontes alimentares convencionais (80, 81). Possuem em sua estrutura 6 a 12 átomos de carbono. Esses ácidos graxos são amplamente encontrados em fontes naturais, como óleo de coco e óleo de palma. Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse em investigar o papel dos TCM na preservação e proteção das células nervosas contra danos e lesões (82, 83).

Um dos principais mecanismos pelos quais os TCM podem exercer efeitos neuroreparadores é por meio da sua rápida metabolização em corpos cetônicos, como o BHB e o AcAc. Esses corpos cetônicos têm a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e fornecer uma fonte alternativa de energia para as células cerebrais durante situações de estresse metabólico, como o AVE (82-86).

Em estudos recentes, de TCM na DC mostra efeitos neuroreparadores devido a várias razões. A cetose induzida pode fornecer uma fonte de energia mais eficiente para o cérebro, especialmente em condições de estresse metabólico, como na lesão cerebral ou nas doenças neurológicas, como como epilepsia refratária, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose múltipla (87-97). Estudos sugerem que os corpos cetônicos podem ter propriedades neuroprotetores, neuroreparadores e moduladoras, além de melhorar o metabolismo cerebral e reduzir a inflamação (77-79, 98).

O ácido decanoico, também conhecido como ácido cáprico, é um ácido graxo saturado de cadeia média com 10 átomos de carbono, um dos principais componentes da DC de TGCM. Ele está presente naturalmente em algumas fontes alimentares, como óleo de coco e óleo de palmiste (99, 100). Tem despertado interesse na área da pesquisa devido às suas propriedades biológicas e potenciais benefícios para a saúde. Estudos têm investigado os efeitos do ácido decanoico como antagonista não competitivo dos receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato), que são receptores ligados à neurotransmissão glutamatérgica no sistema nervoso central (100, 101).

O metabolismo do ácido decanoico é particularmente relevante, uma vez que ele é rapidamente absorvido e metabolizado nas mitocôndrias do fígado. Durante esse processo, o ácido decanoico é convertido em corpos cetônicos, mais especificamente em BHB, que é uma importante fonte alternativa de energia para o cérebro e outros tecidos quando a disponibilidade de glicose é reduzida (102, 103).

Foi observado que o ácido decanoico possui atividade anticonvulsivante tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o que sugere seu potencial na prevenção e controle de convulsões (100, 101, 104). Além disso, estudos têm demonstrado que o ácido decanoico pode exibir atividade antioxidante e anti-inflamatória, reduzindo o estresse oxidativo e a resposta inflamatória no cérebro (57). A pesquisa de *Sharma et al., 2023*, mostrou que o ácido decanoico exibiu propriedades neuroprotetores e neuroreparadores em modelos experimentais de isquemia cerebral. Os resultados sugeriram que o ácido decanoico foi capaz de reduzir a extensão do dano cerebral induzido pela isquemia, possivelmente através de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (57).

Esses achados sugerem que o ácido decanoico pode ter um papel potencialmente importante na neuroreparação. No entanto, é importante ressaltar que a pesquisa nessa área ainda está em estágios iniciais, e são necessários mais estudos para compreender completamente os mecanismos de ação e os efeitos do ácido decanoico, na neuroreparação devido à sua capacidade de inibir os receptores AMPA, portanto é uma perspectiva interessante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas para a proteção contra danos isquêmicos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Estudar o potencial efeito neuroreparador do ácido decanoico no modelo de isquemia cerebral por oclusão da artéria cerebral média (MCAO) em camundongos tratados por 7 e 14 dias.

4.2. Objetivos específicos

Analisar o efeito do tratamento durante 7 e 14 dias com o ácido decanoico em animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral sobre:

- a) déficit motor
- b) déficit de memória
- c) neuroinflamação
- d) expressão de receptores AMPA e na via da autofagia

5. Material e Métodos

5.1 Fármaco

Neste projeto foi utilizado o composto ácido decanoico (Sigma Aldrich, USA), que foi diluído em solução de metilcelulose (0,5%) e administrado por via oral (vo), por gavagem gástrica, em um volume de 10 ml/kg.

5.2 Animais experimentais

Os animais utilizados para os procedimentos experimentais foram camundongos da linhagem Swiss, de 8 semanas de idade pesando entre 40 e 50 g, que foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal de Goiás-UFG. Os animais foram mantidos no biotério experimental dos Departamentos de Ciências Fisiológicas e Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, Biotério DCiF/DFAR. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração e água. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA (PROTOCOLO N°. 048/23) (Apêndice 1).

5.3 Desenho experimental

Para o desenvolvimento do modelo de isquemia cerebral focal induzido pela oclusão da artéria cerebral média (MCAO), foram utilizados dois regimes de tratamento distintos (Figura 3). No primeiro regime, os animais receberam ácido decanoico por via oral (VO) em diferentes doses (62,5, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg) ou veículo (metilcelulose 0,5%), durante 7 dias após a indução do modelo, enquanto no segundo regime, os animais foram tratados com o mesmo composto e mesmas doses por 14 dias após a indução do modelo. Essas diferentes abordagens de tratamento permitiram o estudo dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na proteção induzida pelo ácido decanoico. Os animais foram distribuídos randomicamente em 5 grupos, de acordo com o seguinte esquema: Grupo Sham (grupo que passa por um procedimento cirúrgico, mas não é submetido à oclusão da artéria cerebral média), Grupo veículo (MCAO+ metilcelulose 0,5%), Grupo 62,5 (MCAO+62,5 mg/kg), Grupo 125 (MCAO+125 mg/kg), Grupo 250 (MCAO+250 mg/kg), Grupo 500 (MCAO+500 mg/kg) e Grupo 1000 (MCAO+1000 mg/kg).

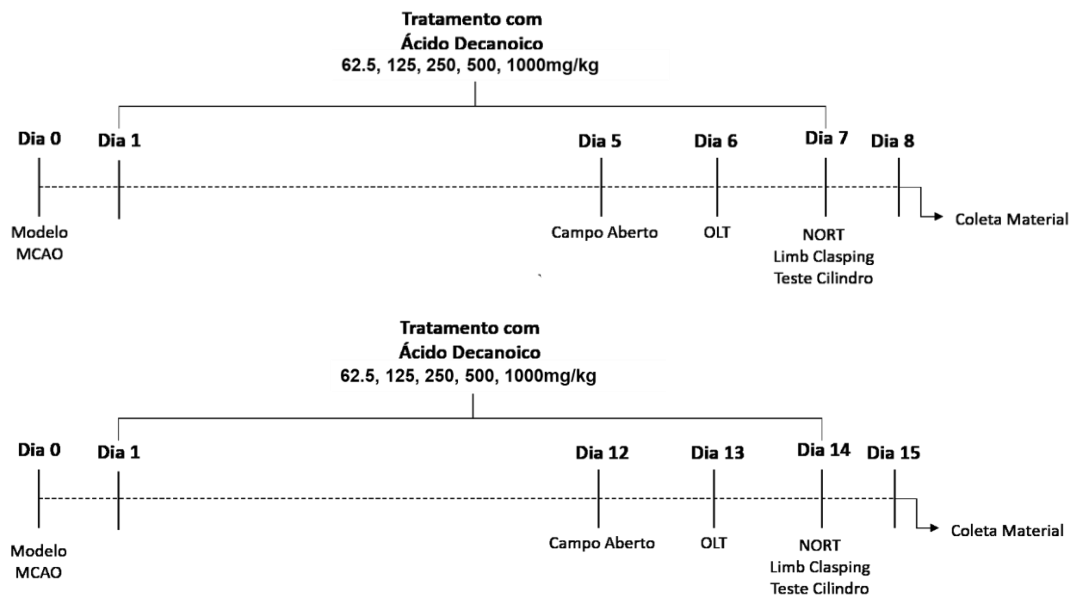


Figura 4. **Diagrama esquemático demonstrando o delineamento experimental.** No dia 0 foi realizada a cirurgia de indução do modelo de MCAO, logo no dia seguinte teve início o tratamento com ácido decanoico (62,5, 125, 250, 500 e 1000 mg/kg por via VO) ou veículo, que durou 7 ou 14 dias. No dia 7 ou 14 finalizaram os testes comportamentais. No dia 8 ou 15 foram realizadas as eutanásias de acordo com os testes que seriam realizados posteriormente.

5.4 Modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO)

O modelo de oclusão permanente da artéria cerebral média (ACM) distal foi realizado como estabelecido previamente (105). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Uma incisão cutânea central de 2 cm na linha média do pescoço foi feita com auxílio de um bisturi. Para expor a artéria carótida comum (ACC), as glândulas salivares foram gentilmente afastadas com fórceps, dando visão à ACC e ao nervo vago. A ACC foi então cuidadosamente dissecada do nervo vago com finos fórceps e ocluída com sutura de seda não absorvível. A incisão na linha média do pescoço foi cuidadosamente fechada com linha de sutura de nylon 0-6. Após a oclusão da ACC, os camundongos foram colocados na mesa cirúrgica com a parte contralateral da cabeça, para expor o hemisfério contralateral. Uma incisão de 1 cm entre o seio retro orbital e o canal auditivo externo foi feita, expondo o músculo temporal. Então, o músculo temporal foi cuidadosamente dissecado, para se visualizar o crânio e a artéria cerebral média. Depois disso, foi realizado uma craniotomia na região exposta usando uma broca odontológica de perfuração com revestimento de 1,6 mm a aproximadamente 8.000 rpm. Uma vez que o osso esteja fino o suficiente para vê-lo como se fosse transparente, ele foi removido

usando uma pinça fina. Por fim, a ACM foi ocluída permanentemente com um cauterizador com 3W de voltagem (Cautermax®). Após os procedimentos cirúrgicos, os camundongos se recuperaram da anestesia em uma temperatura de 25 a 27 °C.

5.5 Avaliação morfológica

Para a análise morfológica da área isquêmica, os cérebros dos camundongos foram removidos e seccionados em lâminas consecutivas de 2 mm de espessura, totalizando 5 seções. Posteriormente, essas seções foram submetidas à coloração utilizando 2% de cloreto de 5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC, Sigma, T8877) (106). O software Image J foi empregado para a análise quantitativa da área de infarto. A determinação da área de infarto (%) foi realizada mediante a aplicação da seguinte fórmula: $(\text{área pálida isquêmica} / \text{área total do córtex esquerdo} + \text{área total do córtex direito}) \times 100$. Esse procedimento proporciona uma avaliação da extensão da área isquêmica.

5.6 Avaliação motora dos animais

5.6.1 Teste do Cilindro

O teste do cilindro é um teste comportamental usado para avaliar os parâmetros de assimetria das patas e coordenação motora em modelos de camundongos com AVC. Como descrito por Schallert e colaboradores, os animais são colocados individualmente dentro de um cilindro transparente com (20 cm de diâmetro e 30 cm de altura) por um período de 5 minutos (Figura 4). O objetivo principal é observar o uso das patas dianteiras durante a atividade exploratória vertical ao longo das paredes do cilindro. Para avaliar o uso da pata dianteira comprometida, registramos o número de contato dos animais nas paredes do cilindro usando a pata dianteira não comprometida (ipsilateral do hemisfério da cirurgia). Nos animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral focal espera-se uma diminuição da utilização da pata contralateral ao hemisfério cerebral que sofreu a isquemia. Nesse sentido, espera-se uma diminuição da razão entre o uso das patas dianteiras contralateral e ipsi, demonstrando uma preferência pelo uso da pata ipsilateral e, portanto, um déficit motor observável em decorrência do dano neuronal (107).

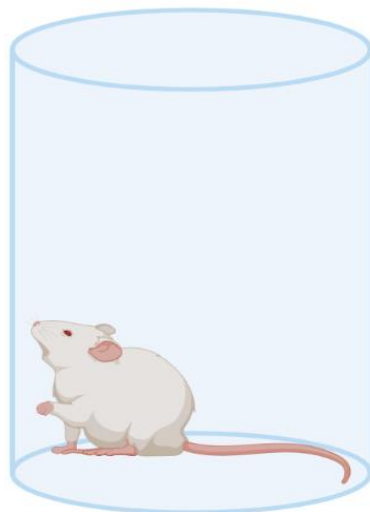


Figura 5. **Representação do teste do cilindro.** Neste teste o animal é colocado dentro de um cilindro transparente e então é filmado por 5 minutos. Depois são quantificados os contatos feitos com as patas dianteiras e classificados como ipsi ou contralaterais em relação ao hemisfério lesionado. Fonte: Biorender.

5.6.2 Teste de *Limb Clasp*ing

O teste *Limb Clasp*ing é um teste comportamental usado para avaliar a atividade motora funcional em modelos de camundongos com AVC. Como descrito por Miedel e colaboradores, a suspensão de camundongos pela cauda induz uma resposta de escape (Figura 5), e este teste usa esse instinto para avaliar os déficits motores correlacionados com a perda da capacidade de estender as patas traseiras e dianteiras. Resumidamente, os animais foram suspensos pela cauda por 10s, e os movimentos das patas traseiras e dianteiras foram gravados com uma câmera de resolução HD. Em seguida, a pontuação de *clasp*ing dos vídeos foi atribuída com base nos critérios previamente estabelecidos. Sendo que, 1 - Sem aperto de membro. Extensão de fuga normal. Um membro posterior apresenta movimento incompleto e perda de mobilidade. Os dedos apresentam movimento normal. 2 - Ambos os membros posteriores exibem movimento incompleto e perda de mobilidade. Os dedos apresentam movimento normal. 3 - Ambos os membros posteriores exibem aperto com dedos enrolados e imobilidade. 4 - Membros anteriores e posteriores exibem aperto e são cruzados, dedos enrolados e imobilidade (108).



Figura 6. **Representação do teste do *limb clasp***. Neste teste o animal é suspenso pela cauda por 10s induzindo uma resposta de escape. Em seguida, é atribuída uma pontuação de *clasp* com base nos critérios previamente estabelecidos. Fonte: Biorender.

5.7 Avaliação da memória dos animais

5.7.1 Teste campo aberto

A mobilidade espontânea e qualquer potencial comportamento semelhante à ansiedade foram avaliados no teste do campo aberto como parte da avaliação de saúde e comportamental, conforme previamente descrito Murtishaw e colaboradores. O campo aberto é uma arena quadrada (45 x 45 x 45 cm) com paredes e piso de acrílico cinza, uniformemente iluminados por luz branca (109) (Figura 6). Cada animal foi colocado no centro da arena e foi permitida a exploração livre do aparato por 6 minutos (110). Esta etapa serviu de habituação para o teste de localização do objeto e foi repetida três vezes. A movimentação dos camundongos foi registrada automaticamente por uma câmera e, posteriormente, foi analisada usando um programa de computador, o Any-maze 7.16. O aparato foi limpo com etanol 70% entre as sessões de cada animal.

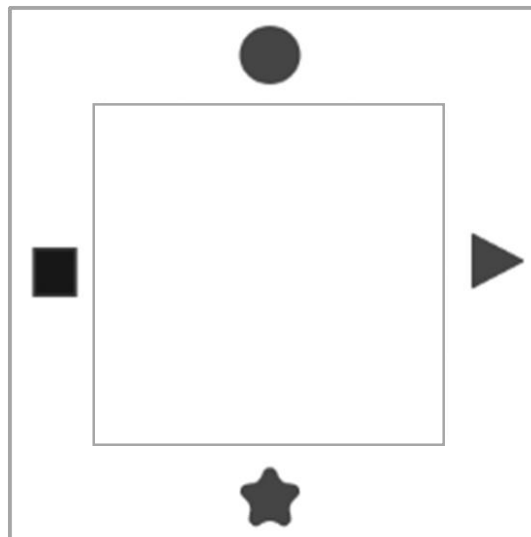


Figura 7. **Representando o teste do campo aberto.** No centro temos a arena onde o animal é colocado. As pistas para a localização do animal são representadas pelas figuras geométricas: retângulo, círculo, triângulo e estrela.

5.7.2 Teste de Localização do Objeto (OLT)

OLT é um teste simples e eficaz que fornece uma medida da memória espacial dependente do hipocampo. A tarefa depende da preferência intrínseca do animal por novidade sem reforço externo adicional e pode, portanto, evitar complicações associadas às respostas emocionais diferenciais. O protocolo consiste em aclimatar o camundongo em uma arena de teste de campo aberto, conforme citado anteriormente, e em seguida, permitir que ele explore por 10 minutos, dois objetos relacionados às pistas ambientais espaciais (fase de treino). Após o término dos 10 minutos, o camundongo é removido da arena e recolocado após um intervalo de 20 minutos, e tem-se início a fase de teste. Nessa fase, um dos objetos é movido de lugar, e então permite-se que ele explore os objetos por mais 10 minutos (Figura 7). Em geral, os camundongos preferem a novidade e, se recordarem da localização dos objetos desde a exposição inicial, passarão mais tempo investigando o objeto movido. Animais com lesões cerebral têm aprendizagem contextual espacial prejudicada e, conseqüentemente, não demonstram preferência por objetos no novo local (110). A % do índice de reconhecimento do objeto movido é então calculada com a seguinte fórmula. Índice de reconhecimento (%) = (Tempo no objeto movido / Tempo no objeto movido + Tempo do objeto não movido) *100.

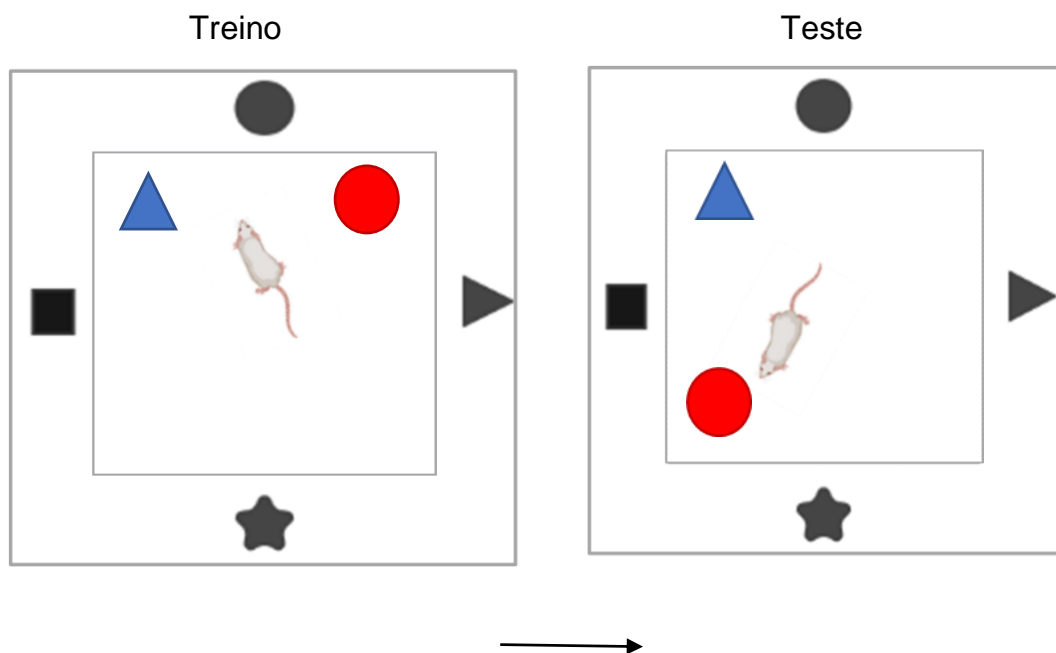


Figura 8. **Representação do teste de localização do objeto.** No centro temos a arena onde o animal é colocado juntamente com os objetos representados pelo triângulo azul e pelo círculo vermelho que estão posicionados em suas devidas localizações na fase de treino e de teste. As pistas para a localização do animal são representadas pelas figuras geométricas: retângulo, círculo, triângulo e estrela.

5.7.3 Teste de reconhecimento do novo objeto (NORT)

O NORT ocorreu 24 horas após a realização do treino do OLT. Nesse teste ocorre a substituição de um dos objetos por um novo objeto (Figura 8). Após a substituição é permitido aos animais a livre exploração por 10 minutos. Os camundongos sem déficit de memória apresentarão preferência espontânea para investigar o novo objeto. Em contraste com a memória de localização de objetos, que depende fortemente de substratos do hipocampo, a memória de reconhecimento de objetos parece depender de uma variedade de regiões cerebrais e o envolvimento do hipocampo é instável. Muitos estudos relatam que lesões ou inativação do hipocampo não afetam a preferência por novos objetos, enquanto outros acham o contrário. No entanto, ainda é uma tarefa comumente usada para avaliar a função geral da memória em roedores (108). A % do índice de reconhecimento de um novo objeto é então calculada com a seguinte fórmula. Índice de reconhecimento (%) = (Tempo no objeto novo / Tempo no objeto novo + Tempo do objeto antigo) *100.

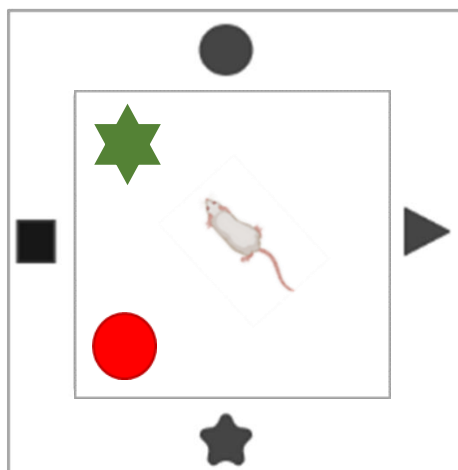


Figura 9. **Representação do teste de reconhecimento do novo objeto.** No centro temos a arena onde o animal é colocado com os objetos representados pelo círculo vermelho e pela estrela verde posicionados em suas devidas localizações na fase de teste. As pistas para a localização do animal são representadas pelas figuras geométricas: retângulo, círculo, triângulo e estrela.

5.8 Análises Bioquímicas

5.8.1 Determinação de biomarcadores inflamatórios por ELISA

Os animais foram eutanasiados, e tiveram o córtex da região direito afetado pela lesão dissecado, homogeneizado e centrifugado, o sobrenadante foi recolhido para análise. Os biomarcadores inflamatórios (TNF α , IL-1 β e IL-6) foram determinados de acordo com o kit imunoenzimático Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA Sandwich). O ELISA foi realizado em placas de microtitulação onde primeiro se fez uma captura de anticorpos monoclonais específicos, depois foram seladas para evitar evaporação e incubadas durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes e bloqueadas com solução de bloqueio (BSA/PBS) e em seguida cobertas e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas três vezes novamente. Os padrões e amostras foram adicionados (50 μ L/poço), após as placas foram bloqueadas, seladas e incubadas, depois as placas foram lavadas três vezes, cobertas e incubadas durante 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas três vezes, cobertas e incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente com estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano (25 μ estreptavidina-HRP/5 ml de PBS) e após, o conjugado não ligado foi removido por lavagem, três vezes. Finalmente a solução reagente do substrato foi adicionada nos poços por 20 min, mantendo as placas fora da luz direta para se ligar com a enzima causando uma mudança de cor nos poços. A

capacidade de absorção de todos os testes ELISA foi lida a 450 nm com um espectrofotômetro leitor de microplacas. As curvas padrão que variam de 15,6 a 2000 pg/ml foram construídas por uma regressão de quatro parâmetros formulados e representada como uma curva linear (log-log). Os resultados são expressos como pg/ml para TNF α (DY410-05), IL-1 β (DY401-05), IL-6 (DY406-05).

5.8.2 Avaliação da dinâmica de proteína no córtex por Western blot

Depois de eutanasiados, os animais tiveram o córtex da região direito afetado pela lesão dissecado, e posteriormente processado com solução tampão de lise para análise de proteínas. Foram preparados 40 μ g dos homogenatos de proteína de cada amostra com tampão de amostra NuPAGE LDS (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com 10 % de b-mercaptoetanol e incubados a 70 °C por 10 min. As amostras foram transferidas para géis Bis-Tris NuPAGE 4–12% e 8 a 16% (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e submetidas à eletroforese conforme recomendado pelo fabricante, seguido de transferência para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL, AmerSham, GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, EUA). Foi utilizada coloração com Ponceau S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para monitorar a eficiência da transferência. Depois as membranas foram inibidas por 45 minutos com TBS (solução salina tamponada com tris, pH 7,4), Tween 20 0,1%, BSA 5%, e então lavadas. Após isso as membranas foram incubadas com seus anticorpos primários *overnight* a 4 °C. No dia seguinte as membranas foram lavadas novamente e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com os anticorpos secundários conjugados com horseradish peroxidase (HRP), goat anti-rabbit IgG (1:3000), e goat anti-mouse IgG (1:3000) (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Depois da incubação as membranas foram submetidas à detecção quimioluminescente com ECL Plus (AmerSham, GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, EUA) conforme descrito pelo fabricante e visualizado no ImageQuant. A análise densitométrica foi realizada usando Scion Image Software Versão Beta 4.0.2 (Scion Corporation, National Institutes of Health, Frederick, MD, EUA). Os seguintes anticorpos primários foram usados: GluR1 (PA5-99537, igG rabbit, 1:2000), GluR2 (32-0300, igG, mouse, 1:500), GluR3 (32-0400, igG mouse, 1:250), β -actina (pa1-183, igG rabbit, 1:1000), mTOR (PA5-20123, igG, 1:500), p-mTOR (44-1125G, igG rabbit, 1:1000), ULK1 (bs-3602R, igG rabbit, 1:2000), p-ULK1 (PA5-102856, igG rabbit, 1:3000), Beclin 1 (PA1-16857, igG rabbit, 1:2000), LC3B (PA1-46286, igG rabbit, 1:1000), P62 (PA5-27247, igG rabbit, 1:3000), p-P62 (PA5-78267, igG rabbit,

1:3000) BCL2 (PA5-27094, igG rabbit, 1:3000), p-BCL2 (PA5-99356, igG rabbit, 1:2000).

5.9 Análise estatística

A comparação dos dados de padronização do modelo de MCAO foi realizada por meio do teste T-Student. Em relação à análise de dados paramétricos, empregou-se a análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Dunnet, considerando como estatisticamente significativos os valores de P menores que 0,05. Para dados não-paramétricos, conduziu-se o teste de Kruskal-Wallis, também levando em conta os valores de P inferiores a 0,05 como indicativos de significância estatística. Os dados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e foram processados utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

6. Resultados

6.1 Ácido decanoico promove uma diminuição na área da isquemia em modelo animal de isquemia cerebral

A análise morfológica realizada por meio da técnica de TTC para avaliar a área de isquemia após 7 dias de tratamento revelou que o ácido decanoico contribuiu para uma redução significativa da isquemia (Figura 9). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo Sham ($0,00 \pm 0,00\%$) e o grupo veículo ($21,36 \pm 3,42\%$), ($P < 0,001$), evidenciando a eficácia do modelo de isquemia cerebral em induzir lesão no tecido cerebral. Adicionalmente, os grupos submetidos ao tratamento com ácido decanoico nas doses de 62,5 mg/kg ($11,37 \pm 2,78\%$), 125 mg/kg ($8,12 \pm 3,08\%$), 250 mg/kg ($4,06 \pm 1,85\%$), 500 mg/kg ($5,39 \pm 2,06\%$) e 1000 mg/kg ($10,07 \pm 1,93\%$) apresentaram redução significativa na área de isquemia em comparação com o grupo veículo ($21,36 \pm 3,42\%$), com valores de P de 0,0248, 0,0017, 0,001, 0,0001 e 0,0089, respectivamente. Isso indica que todas as doses testadas foram efetivas na diminuição da área de infarto. No entanto, a análise morfológica utilizando a técnica de TTC após 14 dias de tratamento não identificou área de isquemia em qualquer um dos grupos amostrais, sugerindo uma ineficiência da técnica para detectar a lesão isquêmica 14 dias após a cirurgia.

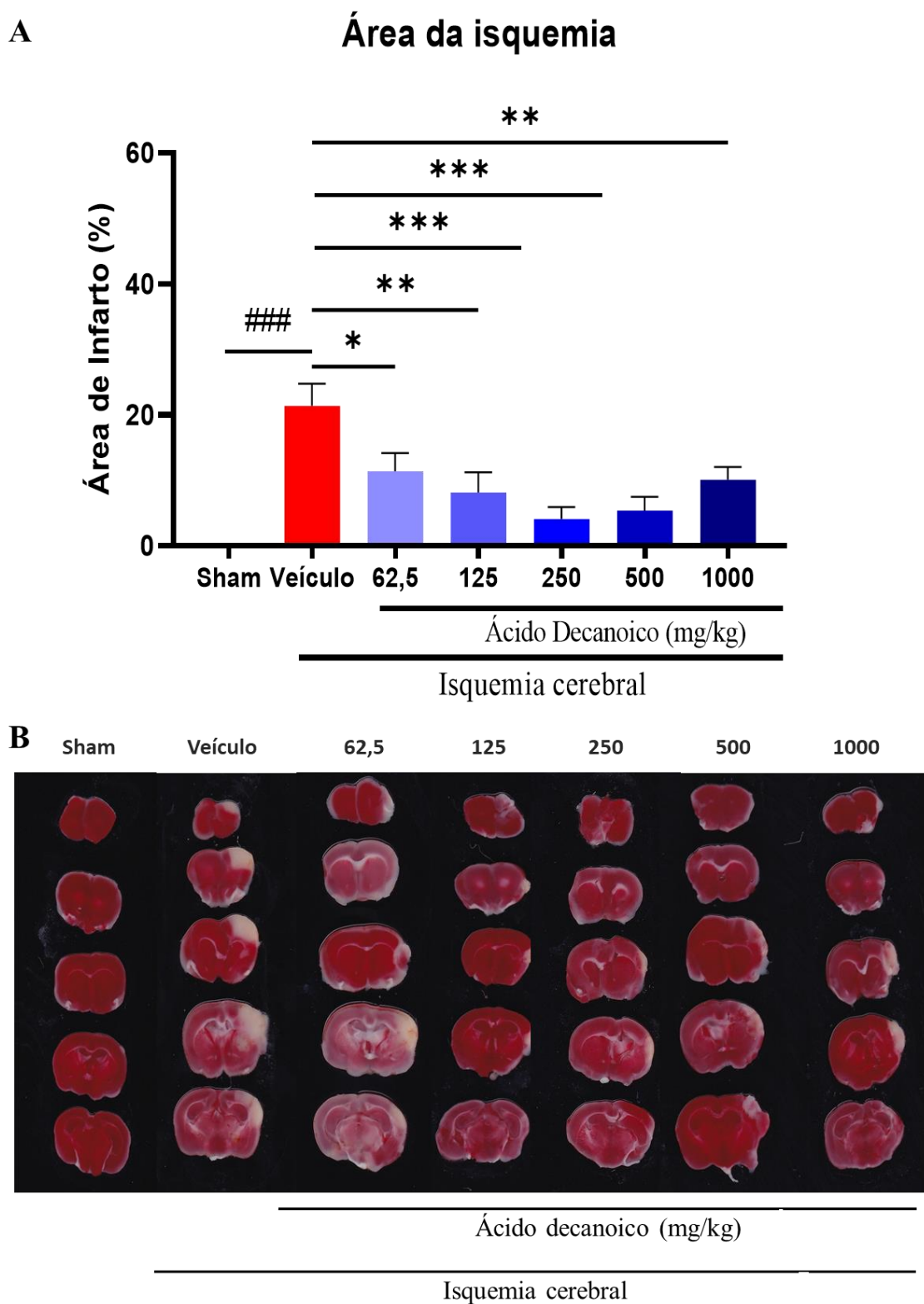


Figura 10. **Ácido decanoico promove uma diminuição na área da isquemia em modelo animal de isquemia cerebral após 7 dia de tratamento.** A. Análise da área de infarto obtida com TTC. B. Imagens representativas da coloração com TTC. Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. $n = 8$ animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$.

6.2 Ácido decanoico promove uma melhora no *score* neurológico no teste de *Limb Clasp*ing

O teste de *limb clasp*ing é utilizado para avaliar o déficit motor em modelos animal de isquemia cerebral. No presente estudo, o tratamento com ácido decanoico durante 7 e 14 dias foi capaz de promover uma melhora *score* neurológico. Observamos que o grupo veículo ($2,00 \pm 0,25$), apresentou um aumento significativo no *score* neurológico quando comparado com o grupo Sham ($0,00 \pm 0,00$), ($P < 0,001$), indicando um comprometimento motor. No entanto, o tratamento nas doses de 125 mg/kg ($0,62 \pm 0,26$), 250 mg/kg ($0,37 \pm 0,18$) e 500 mg/kg ($0,55 \pm 0,24$) resultou em uma redução significativa no *score* neurológico em comparação com o grupo veículo ($2,00 \pm 0,25$), ($P = 0,027$, $P = 0,0035$, $P = 0,0107$ respectivamente), após 7 dias de tratamento (Figura 10A). Após 14 dias de tratamento (Figura 10B), o tratamento com as doses de 125 mg/kg ($1,00 \pm 0,42$), 250 mg/kg ($0,25 \pm 0,16$) e 500 mg/kg ($0,62 \pm 0,26$), também resultaram em uma redução significativa do *score* neurológico em comparação com o grupo veículo ($2,50 \pm 0,18$), ($P = 0,0475$, $P = 0,0004$, $P = 0,0093$ respectivamente). Esses achados indicam que o ácido decanoico foi capaz de melhorar a contração das patas, indicando uma recuperação funcional. A redução no *score* neurológico sugere que esse composto pode ter efeitos neuroreparadores e promover a recuperação motora em um modelo de isquemia cerebral focal.

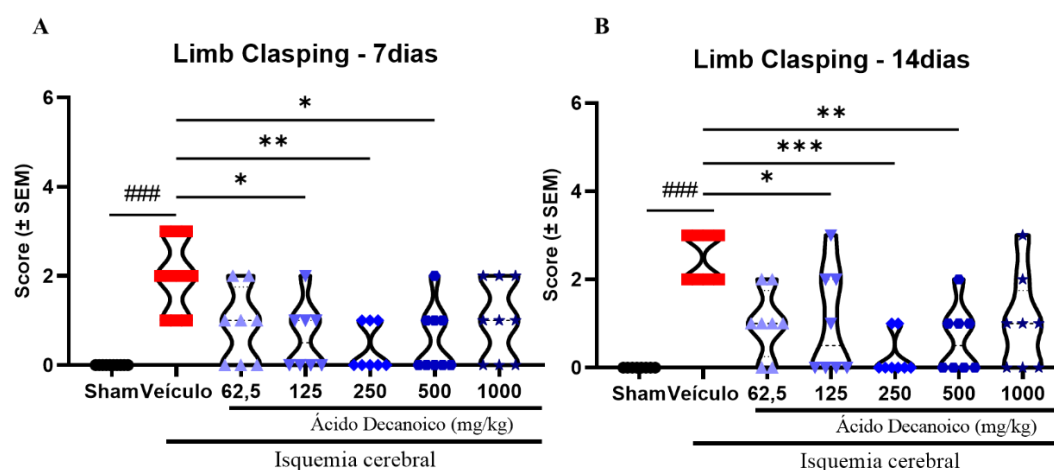


Figura 11. Efeito do Ácido decanoico promove uma melhora no *score* neurológico no teste de *Limb Clasp*ing. A. temos a pontuação do *score* neurológico com 7 dias de tratamento com ácido decanoico. B. a pontuação do *score* neurológico com 14 dias de tratamento com ácido decanoico. Dados estão sendo apresentados como média ± Erro padrão de Média (± SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por Kruskal-Wallis. n = 8/10 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, #### $p < 0,001$.

6.3 Ácido decanoico promove uma melhora nos déficits motores no teste do cilindro

O resultado do teste de cilindro com o tratamento com ácido decanoico durante 7 e 14 dias mostrou que ele foi capaz de promover uma melhora na assimetria e na coordenação motora dos animais. Após 7 dias de tratamento (Figura 11A), observou-se que o grupo veículo ($126,40 \pm 3,02\%$) apresentou uma assimetria maior no uso das patas, utilizando mais a pata ipsilateral em comparação ao grupo Sham ($99,25 \pm 1,79\%$), ($P < 0,001$), que utilizou ambas as patas igualmente. Isso sugere que o grupo veículo teve um impacto negativo na função motora, resultando em uma maior preferência pelo uso de uma única pata. Já nos grupos que receberam as doses de 62,5 mg/kg ($112,30 \pm 2,75\%$), 125 mg/kg ($110,30 \pm 2,12\%$), 250 mg/kg ($100,40 \pm 1,13\%$), 500 mg/kg ($105,40 \pm 1,47\%$) e 1000 mg/kg ($112,90 \pm 2,48\%$) de ácido decanoico, apresentaram um comportamento mais simétrico das patas dianteiras em comparação ao grupo veículo ($126,40 \pm 3,02\%$), ($P = 0,0022$, $P = 0,0020$, $P < 0,001$, $P < 0,001$, $P = 0,0042$, respectivamente). Isso indica que o tratamento com essas doses de ácido decanoico teve um efeito positivo na recuperação da função motora, reduzindo a assimetria no uso das patas dianteiras em relação ao grupo controle.

Após 14 dias de tratamento (Figura 11B), também foi observada uma diferença significativa entre o grupo Sham ($100,00 \pm 0,00\%$) e o grupo veículo ($118,00 \pm 3,00\%$), ($P < 0,001$), assim como nos grupos tratados com as doses de 125 mg/kg ($105,00 \pm 2,50\%$), 250 mg/kg ($99,38 \pm 3,05\%$), 500 mg/kg ($105,00 \pm 1,37\%$) e 1000 mg/kg ($107 \pm 2,19\%$), ($P = 0,0036$, $P < 0,001$, $P = 0,0036$, $P = 0,0196$ respectivamente), indicando que o tratamento com ácido decanoico continuou a promover uma maior simetria no uso das patas dianteiras em comparação ao grupo veículo, mesmo após um período mais prolongado de administração.

Esses resultados sugerem que o ácido decanoico possui um potencial efeito positivo na recuperação da função motora, reduzindo a assimetria no uso das patas dianteiras após um evento de isquemia cerebral, com melhorias observadas nos testes comportamentais em animais tratados com diferentes doses do composto.

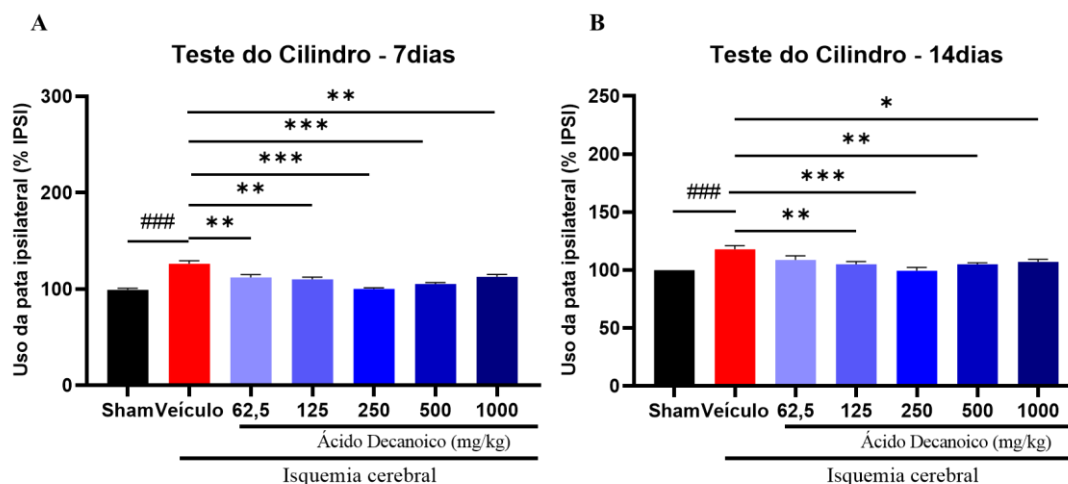
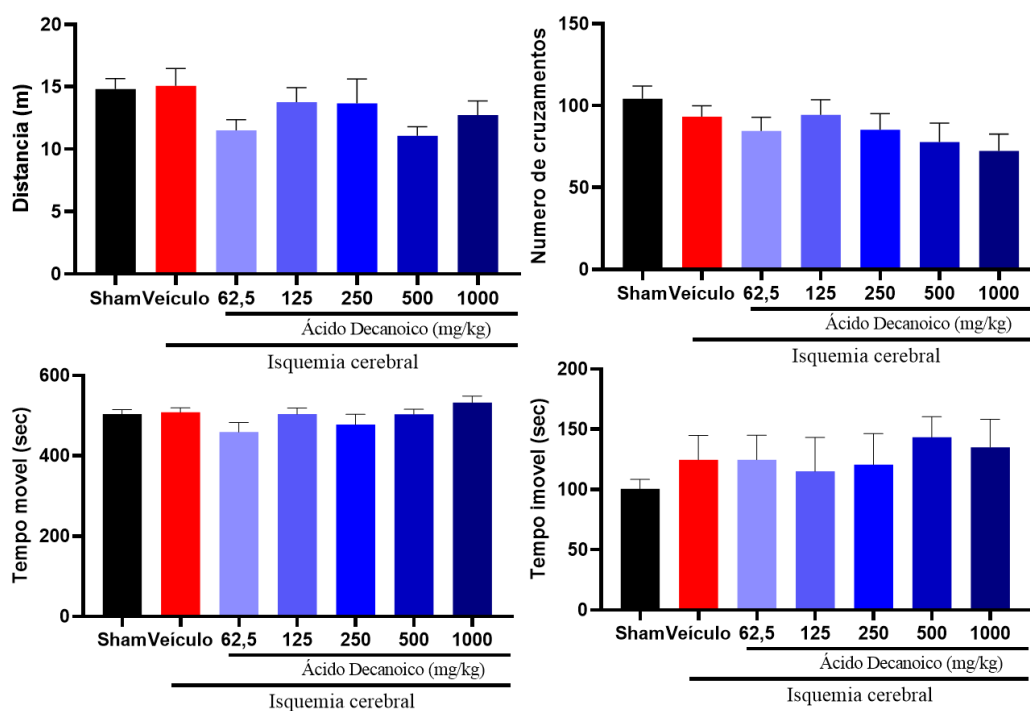


Figura 12. Efeito **Ácido decanoico promove uma melhora nos difíceis motores no teste do cilindro**. A. a porcentagem de utilização da pata ipsilateral para os contatos no cilindro após 7 dias de tratamento com ácido decanoico. B. a porcentagem de utilização da pata ipsilateral para os contatos no cilindro após 14 dias de tratamento com ácido decanoico. Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. $n = 8$ animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$.

6.4 **Ácido decanoico não promove alteração no comportamento motor no teste de campo aberto**

No teste do campo aberto, observou-se que em ambos os períodos de tratamento de 7 e 14 dias com ácido decanoico, não apresentou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados (Figura 12). Esses resultados indicam que, para esse teste em específico, não houve alteração na mobilidade espontânea dos animais, o que é um aspecto positivo para a realização das análises de memória (OLT e NORT), pois permite a realização de testes cognitivos sem interferências de fatores motores. Dessa forma, é possível realizar análises de memória, com mais confiabilidade e precisão.

Campo Aberto – 7dias



Campo Aberto – 14dias

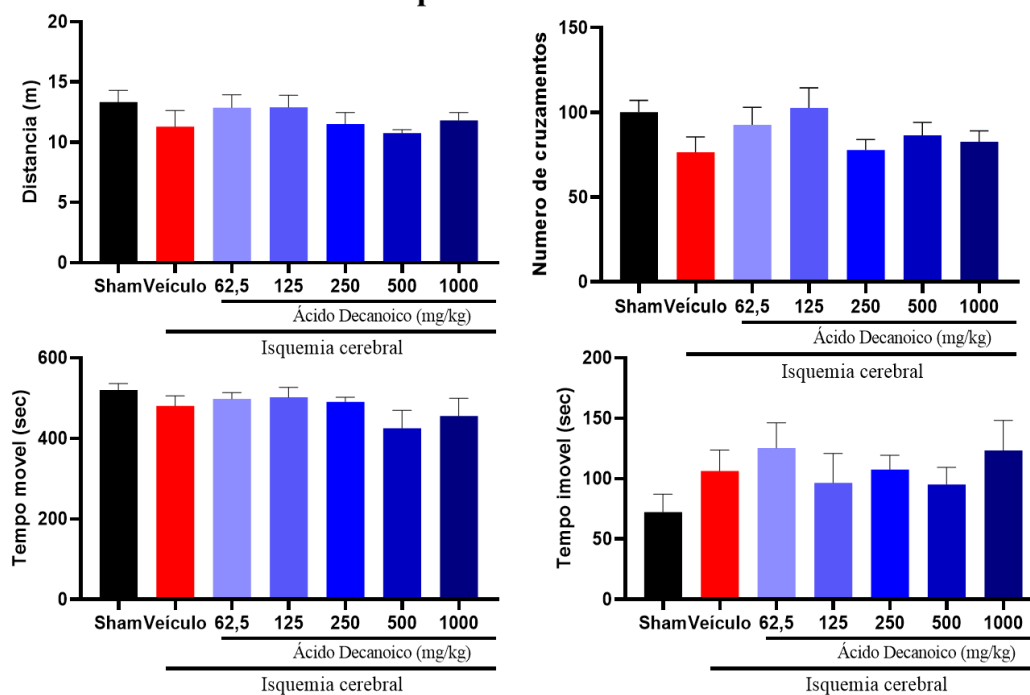


Figura 13. **Ácido decanoico não promove alteração no comportamento motor no teste de campo aberto.** A-D. teste campo aberto após 7 dias de tratamento com ácido decanoico. E-H. teste campo aberto após 14 dias de tratamento com ácido decanoico. Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. n = 8 animais por grupo.

6.5 Ácido decanoico promove uma melhora na memória espacial no teste de localização do objeto

Os resultados do teste de localização do objeto objetos (OLT) foram analisados para avaliar a memória espacial dos animais e constatou uma melhora na memória espacial, após tratamento com ácido decanoico por 7 e 14 dias.

Observou-se que durante a fase de treino (Figura 13A), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos testados em ao índice de reconhecimento. No entanto, durante a fase de teste (Figura 13B), na qual houve a mudança de localização do objeto, notamos uma redução significativa no percentual de investigação no grupo veículo ($72,05 \pm 3,07\%$) em comparação com o grupo Sham ($101,70 \pm 2,29\%$), ($P=0,0014$). Por outro lado, o tratamento com ácido decanoico nas doses de 250 mg/kg ($94,56 \pm 6,17\%$) e 500 mg/kg ($93,04 \pm 1,76\%$), ($P=0,0277$, $P=0,0368$, respectivamente), após 7 dias de tratamento, resultou em um aumento desse percentual em comparação com o grupo veículo.

Após 14 dias de tratamento, na fase de treino não foi presenciado diferenças entre os grupos (Figura 13C), entretanto na fase de teste (Figura 13D) houve uma redução no percentual de investigação no grupo veículo ($74,64 \pm 3,54\%$) em comparação com o grupo Sham ($100,00 \pm 4,49\%$) ($P=0,0008$). Já com o tratamento nas doses de 125 mg/kg ($96,94 \pm 3,03\%$), 250 mg/kg ($100,80 \pm 2,80\%$) e 500 mg/kg ($96,75 \pm 4,92\%$), ($P=0,0038$, $P=0,0006$, $P=0,0042$ respectivamente), resultou em um aumento no potencial de exploração do objeto movido. Sendo assim comprovando que o ácido decanoico pode preservar a função cognitiva e de memória espacial e que o ID pode corroborar com os resultados do teste de OLT.

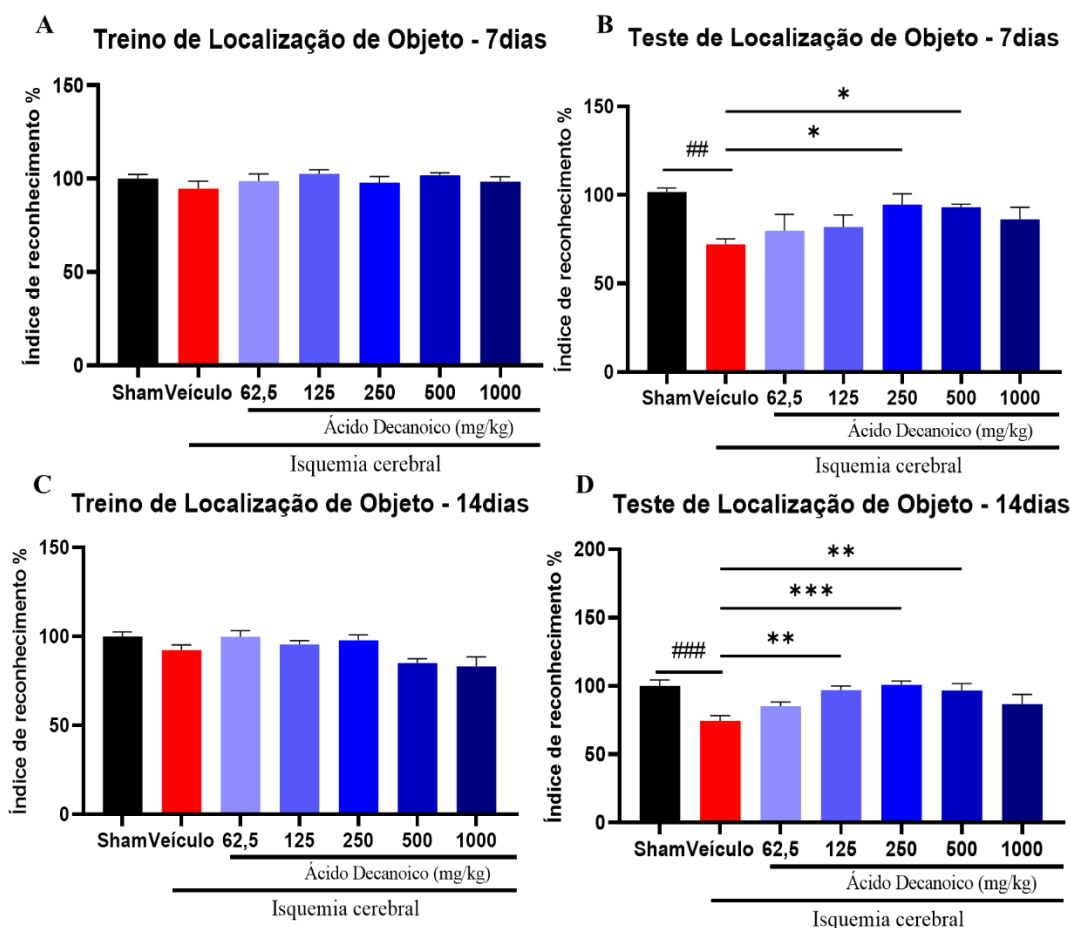


Figura 14. **Ácido decanoico promove uma melhora na memória espacial no teste de localização do objeto durante 7 e 14 dias de tratamento.** A. índice de reconhecimento de localização do objeto na fase de treino com 7 dias de tratamento. B. temos o índice de reconhecimento de localização do objeto na fase de teste com 7 dias de tratamento. C. índice de reconhecimento de localização do objeto na fase de treino com 14 dias de tratamento. D. temos o índice de reconhecimento de localização do objeto na fase de teste com 14 dias de tratamento. Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. $n = 8$ animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$.

6.6 Ácido decanoico promove uma melhora a memória contextual no teste de reconhecimento do novo objeto

Com o resultado do NORT com o tratamento com ácido decanoico durante 7 e 14 dias demonstrou-se a eficácia deste composto na preservação da memória contextual. Durante 7 dias de tratamento (Figura 14A) observou uma diminuição no percentual de investigação do novo objeto no grupo veículo ($75,53 \pm 4,60\%$), comparado com o grupo Sham ($100,00 \pm 3,11\%$), ($P=0,0003$), assim como, houve uma diferença entre veículo e os grupos tratados com ácido decanoico nas doses de 125 mg/kg ($92,31 \pm 4,15\%$), 250 mg/kg ($99,35 \pm 3,49\%$), 500 mg/kg ($92,58 \pm 3,00\%$) e 1000 mg/kg ($92,36 \pm 3,44\%$),

($P=0,0308$, $P=0,0009$, $P=0,0213$, $P=0,0301$, respectivamente), portanto, constatou-se que o tratamento promoveu um aumento na investigação do novo objeto. O resultado com 14 dias de tratamento (Figura 14B) também demonstrou essa diferença entre o grupo Sham ($100,00 \pm 4,02\%$) com grupo veículo ($65,01 \pm 4,28\%$) tendo uma diminuição no percentual de investigação ($P<0,001$). Já com grupos tratados com ácido decanoico nas doses de 62,5 mg/kg ($82,78 \pm 95,12\%$), 125 mg/kg ($95,10 \pm 2,96\%$), 250 mg/kg ($102,30 \pm 3,19\%$), 500 mg/kg ($91,63 \pm 6,16\%$) e 1000 mg/kg ($91,50 \pm 3,66\%$) observou-se um aumento no percentual de investigação do objeto novo, ($P=0,0283$, $P<0,001$, $P<0,001$, $P=0,0044$, $P=0,0042$, respectivamente).

Esses resultados sugerem que o tratamento com ácido decanoico melhora a capacidade de reconhecimento de novos objetos, tendo assim efeitos positivos na recuperação da memória contextual dos animais modelo de isquemia.

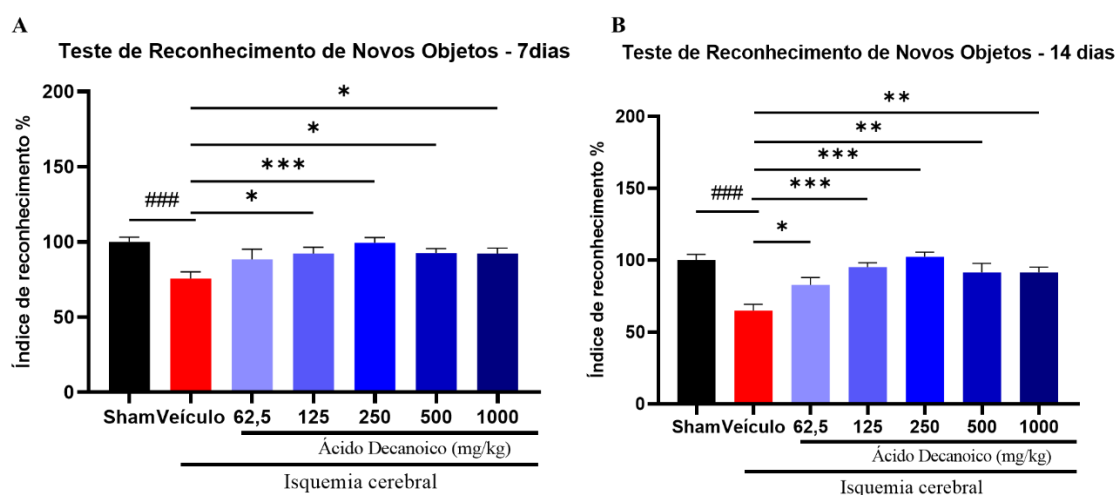


Figura 15. **Ácido decanoico promove uma melhora a memória contextual no teste de reconhecimento do novo objeto.** A. índice de reconhecimento de um novo objeto, após 7 dias de tratamento com ácido decanoico. B. índice de discriminação de um novo objeto após 7 dias de tratamento com ácido decanoico. C. índice de reconhecimento de um novo objeto, após 14 dias de tratamento com ácido decanoico. D. índice de discriminação de um novo objeto após 14 dias de tratamento com ácido decanoico. Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnett. $n = 8$ animais por grupo. * $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,001$, ### $p<0,001$.

6.7 Ácido decanoico promoveu diminuição em biomarcadores pro-inflamatórios no córtex em modelo animal de isquêmica cerebral

Após verificar os efeitos promissores do AD na memória dos animais, sugerindo um efeito neuroreparador, resolveu-se realizar análises mais aprofundadas para compreender os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos neuroreparadores observados. Portanto, analisamos os biomarcadores pró-inflamatórios, interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF α) (Figura 15) após 7 dias de tratamento com ácido decanoico. Foi observado que o grupo veículo ($8,98 \pm 1,42$) demonstrou um aumento significativo ($P < 0,001$) nas concentrações de IL-1 β em comparação com o grupo Sham ($2,18 \pm 0,09$). Já no tratamento com ácido decanoico nas doses de 62,5 mg/kg ($4,31 \pm 0,63$), 125 mg/kg ($4,12 \pm 0,839$) e 250 mg/kg ($4,00 \pm 0,55$) resultou em uma redução significativa ($P = 0,00119$, $P = 0,0013$ e $P = 0,0010$, respectivamente) nas concentrações dessas IL-1 β , comparado ao grupo veículo (Figura 15A). Além disso, as concentrações de IL-6 também aumentaram no grupo veículo ($2,48 \pm 0,14$) comparado como Sham ($1,80 \pm 0,15$) ($P = 0,0066$) e com os tratamentos nas doses de 125 mg/kg ($1,97 \pm 0,14$) e 250 mg/kg ($1,77 \pm 0,06$) houve uma redução comparada com o veículo ($P = 0,0582$ e $P = 0,0046$, respectivamente) (Figura 15B). O TNF α obteve o mesmo padrão de aumento no grupo veículo ($1,76 \pm 0,17$) comparado com o Sham ($1,76 \pm 0,13$) ($P = 0,0066$) e uma diluição da dose maior de 250 mg/kg ($1,23 \pm 0,10$) ($P = 0,0272$) de ácido decanoico comparado como veículo (Figura 15C).

Esse fato indica que há uma redução significativa nas concentrações dessas citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF α) após o tratamento com ácido decanoico, o que sugere que a está exercendo um efeito anti-inflamatório, diminuindo a resposta inflamatória associada à isquemia cerebral.

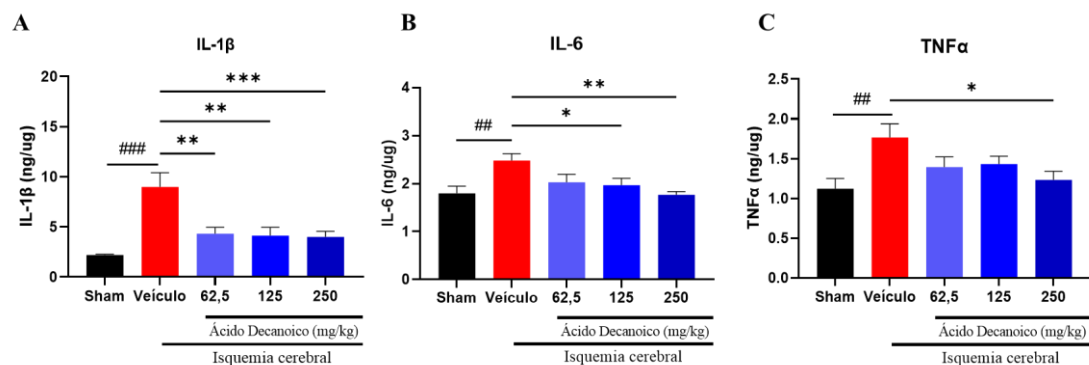


Figura 16. Quantificação da concentração de proteínas pro inflamatórias, após 7 dias de tratamento com ácido decanoico. A. Concentrações de IL-1 β . B. Concentrações de IL-6. C. Concentrações de TNF α . Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. n = 6 animais por grupo.

6.8 Ácido decanoico na expressão de AMPAR no modelo de MCAO

Seguindo a pesquisa, o foco direcionou-se em continuar exploração das vias extracelulares, mas também explorar as vias intracelulares que podem ser moduladas pelo ácido decanoico no córtex, por meio da técnica de Western blot. A investigação teve início com a avaliação das vias extracelulares de expressão das proteínas de subunidades do receptor AMPA (GluR1, GluR2 e GluR3) após 7 dias de tratamento (Figura 16). Os resultados indicaram que o ácido decanoico, em concentrações de 62,5, 125 e 250 mg/kg, não provocou alterações na composição das subunidades do receptor AMPA (GluR1, GluR2 e GluR3).

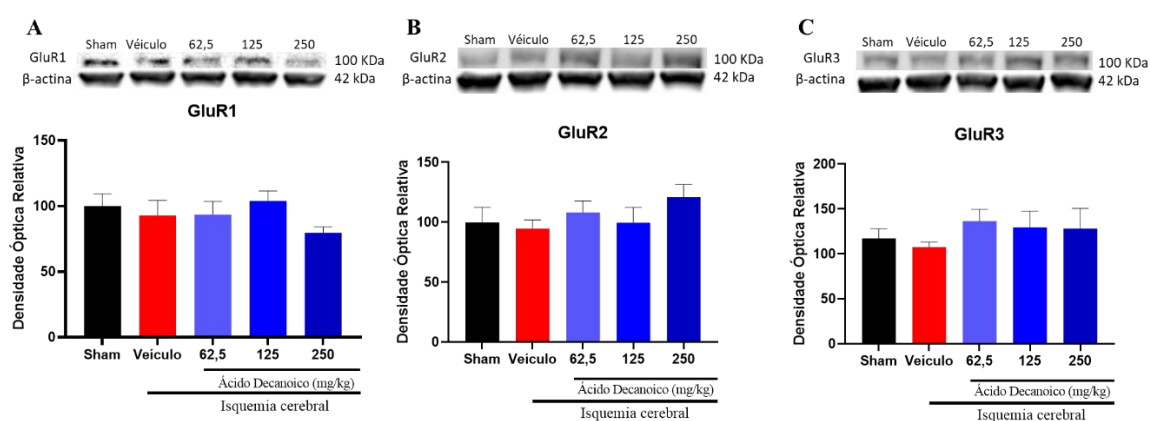


Figura 17. Quantificação da concentração de proteínas envolvidas nas subunidades do receptor AMPA, após 7 dias de tratamento com ácido decanoico. A. Expressão de GluR1. B. Expressão de GluR2. C. Expressão do GluR3. Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. n = 6 animais por grupo.

Já após 14 dias de tratamento com ácido decanoico observou-se que houve uma diferença significativa no GluR1 (Figura 17A), no grupo Sham ($100,00 \pm 5,70$), foi observado uma diminuição na expressão de GluR1, se comparando grupo veículo ($136,10 \pm 10,05$), ($P=0,0193$), entretanto com os tratamentos não houve diferença significativa. Assim como, não foram evidenciadas alterações nas concentrações de GluR2 e GluR3 em comparação com o grupo veículo (Figura 17B e C).

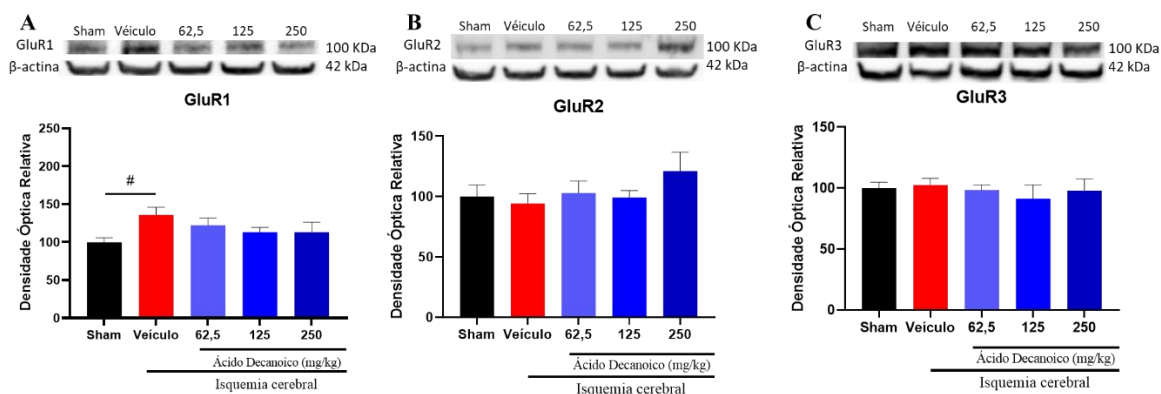


Figura 18. **Quantificação da concentração de proteínas envolvidas nas subunidades do receptor AMPA, após 14 dias de tratamento com ácido decanoico.** A. Expressão de GluR1. B. Expressão de GluR2. C. Expressão do GluR3. Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. $n = 6$ animais por grupo. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$.

6.9 Ácido decanoico na expressão de proteínas associadas à autofagia no modelo de MCAO

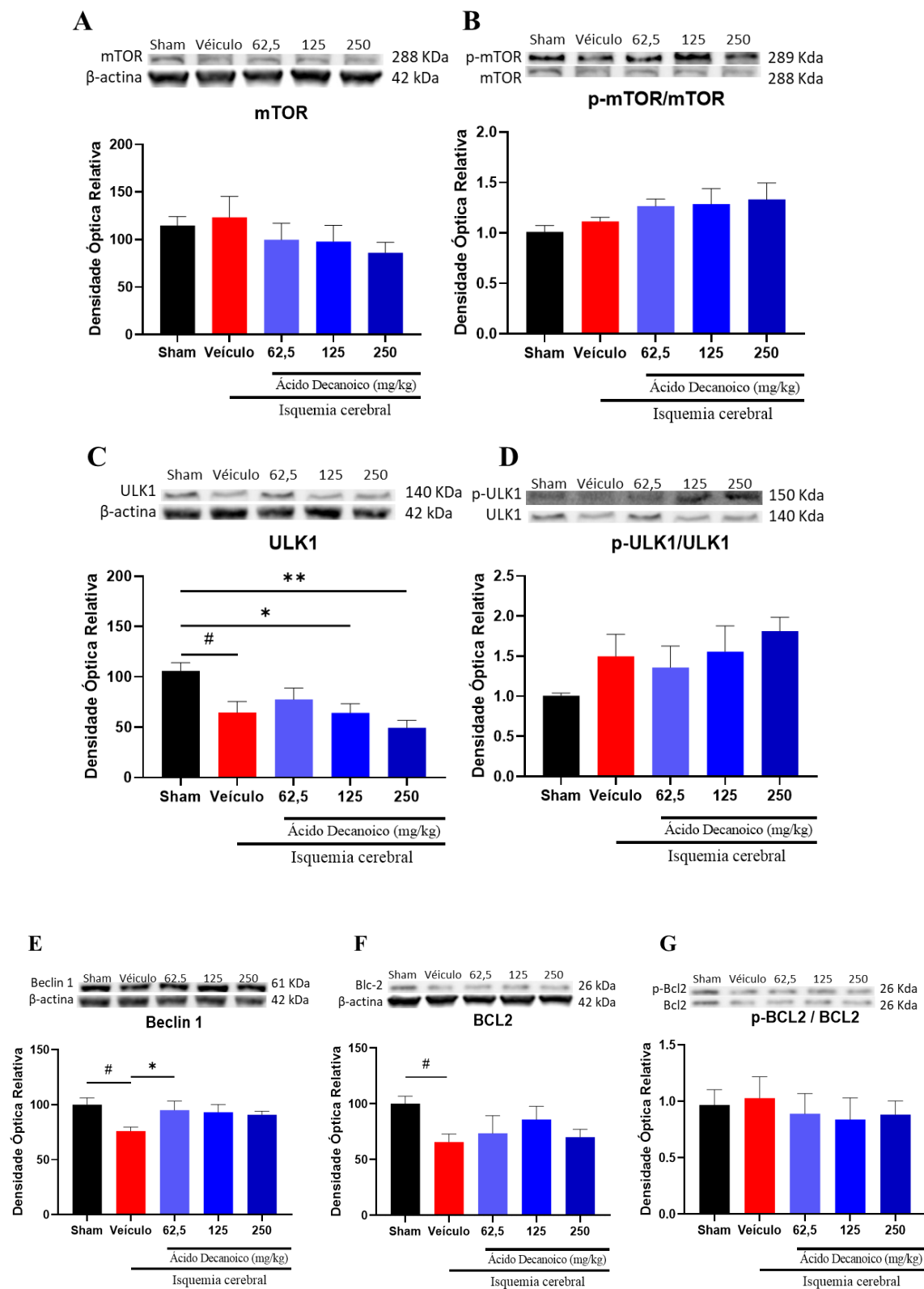
Posteriormente, o foco foi direcionado à exploração das vias intracelulares relacionadas à autofagia, investigando a possível modulação pelo ácido decanoico no córtex. Após um período de 7 dias de tratamento, foram observadas alterações nas concentrações de proteínas envolvidas nas vias de mTOR e autofagia. No entanto, essas mudanças parecem não estar diretamente relacionadas ao ácido decanoico (Figura 18). Não se registrou diferença significativa nas concentrações totais de mTOR nem na sua forma fosforilada entre os grupos (Figura 18A-B).

A análise inicial da via de autofagia, focada na expressão de ULK1 e sua forma fosforilada, indicou alterações distintas. Observou-se uma diminuição na expressão total de ULK1 no grupo veículo ($64,58 \pm 11,06$) em comparação ao grupo Sham ($105,90 \pm 8,19$), com $P=0,0432$, sugerindo uma resposta específica às condições isquêmicas. Da mesma forma, uma redução nas doses de 125 mg/kg ($64,24 \pm 9,09$) e 250 mg/kg ($49,36$

$\pm 7,51$), com $P=0,0410$ e $P=0,0037$, respectivamente, em comparação ao Sham, também resultou em uma diminuição na expressão total de ULK1 (Figura 18C). Não foram identificadas diferenças significativas na forma fosforilada de ULK1 entre os grupos (Figura 18D).

A avaliação subsequente focou na expressão de Beclin1 e Bcl-2. A expressão de Beclin1 aumentou no grupo Sham ($100,00 \pm 6,22$) em relação ao grupo veículo ($76,07 \pm 3,67$), com $P=0,0133$. Um aumento também foi observado no grupo com dose de 62,5 mg/kg ($95,04 \pm 8,22$), com $P=0,0448$, comparado ao veículo (Figura 18E). Quanto à proteína Bcl-2, houve um aumento no grupo Sham ($100,00 \pm 6,79$) em comparação ao grupo veículo ($65,73 \pm 7,09$), com $P=0,0358$ (Figura 18F). No entanto, não foram detectadas diferenças significativas nos grupos tratados em comparação ao veículo. Em relação à forma fosforilada de Bcl-2, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 18G), indicando que o ácido decanoico pode ter um efeito limitado na regulação da expressão de Beclin1/Bcl-2 durante a isquemia cerebral.

Os resultados obtidos após 7 dias de tratamento com ácido decanoico revelaram padrões específicos nas concentrações de proteínas relacionadas ao fluxo autofágico. Notavelmente, a proteína p62 e sua forma fosforilada, p-p62, não mostraram alterações significativas em resposta ao tratamento, sugerindo que, nesse período, o ácido decanoico não afetou a expressão ou fosforilação dessa proteína (Figura 18H-I). No entanto, observou-se um aumento significativo na concentração de LC3II na dose de 62,5 mg/kg ($107,70 \pm 3,77$) em comparação ao grupo veículo ($83,73 \pm 8,62$), com $P=0,0270$ (Figura 18K). Além disso, a análise da razão LC3II/LC3I indicou um aumento significativo na dose de 250 mg/kg ($1,38 \pm 0,04$) em relação ao veículo ($1,02 \pm 0,07$), com $P=0,0483$ (Figura 18L).



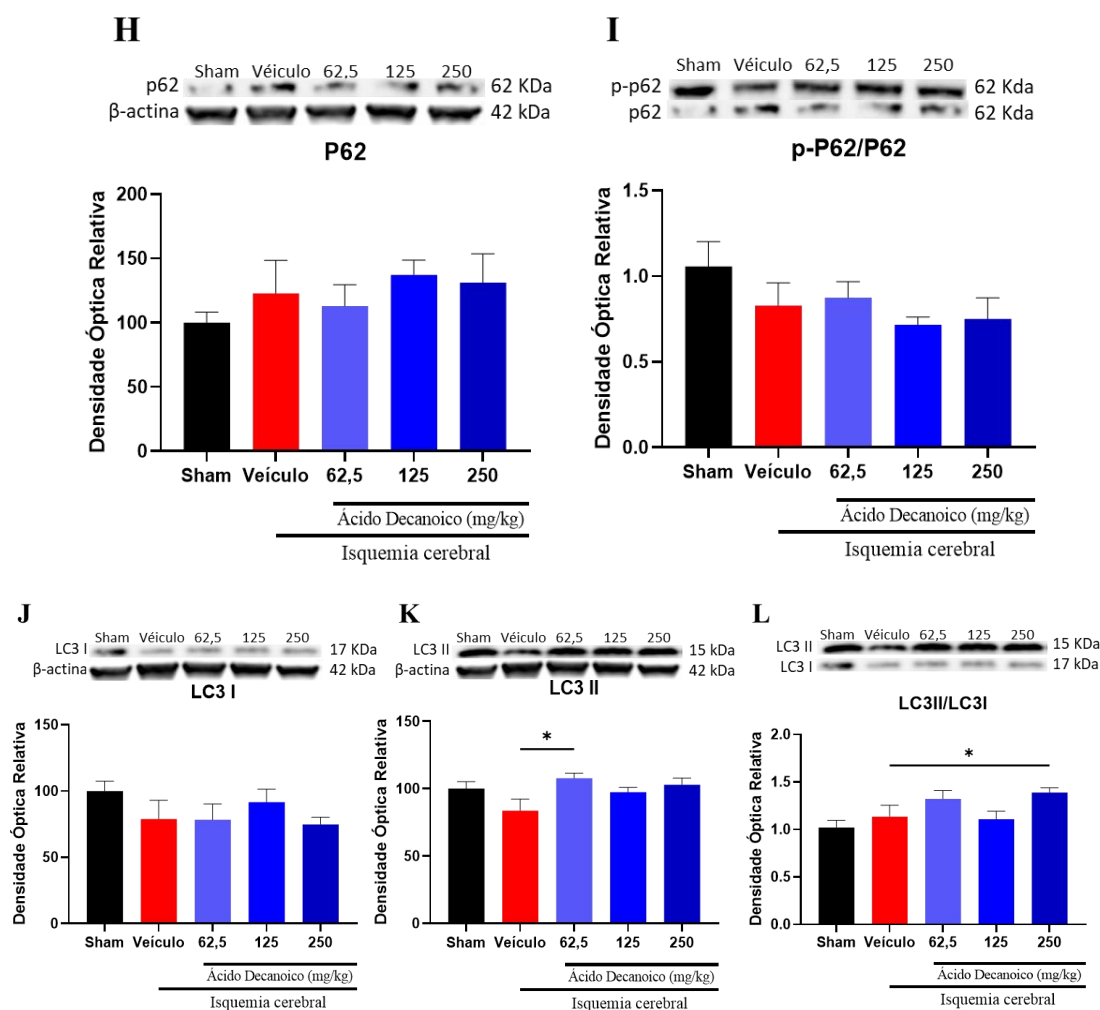
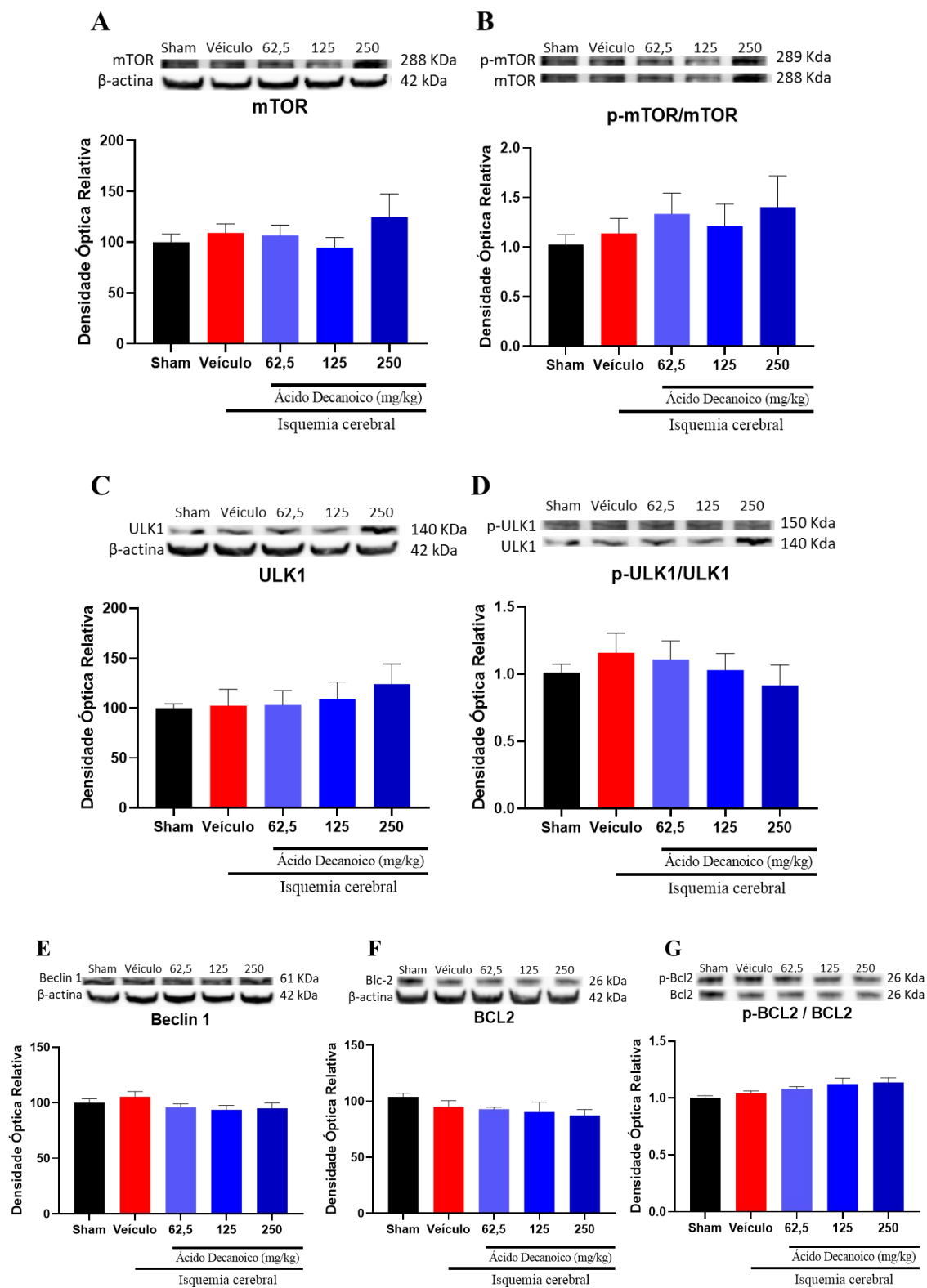


Figura 19. Quantificação da concentração de proteínas envolvidas na via do mTOR e via da autofagia, após 7 dias de tratamento com ácido decanoico. A. Expressão de mTOR. B. Concentrações de fosforilação de mTOR. C. Expressão do ULK 1. D. Concentrações de fosforilação do ULK 1. E. Expressão de Beclin 1. F. Concentrações de fosforilação de Bcl-2. G. Concentrações de fosforilação de Bcl-2. H. Expressão de p62. I. Concentrações de fosforilação de p62. J. Expressão do LC3 I. K. Expressão do LC3 II. L. Razão LC3I/CL3II. Dados estão sendo apresentados como média ± Erro padrão de Média (± SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. n = 6/5 animais por grupo. *p<0,05, **p<0,005, #p<0,05.

Por outro lado, os resultados da análise das vias de mTOR e autofagia em animais tratados por 14 dias com ácido decanoico não demonstraram diferenças significativas entre os grupos (Figura 19A-B). Isso indica que o tratamento por 14 dias não impactou as concentrações de ativação dessas vias de sinalização. Da mesma forma, as proteínas ULK1, p-ULK1, Beclin1, Bcl-2 e p-Bcl-2 não apresentaram variações significativas, sugerindo que o ácido decanoico não influenciou a regulação da autofagia nesse período (Figura 19C-L). A estabilidade nas concentrações dessas proteínas após 14 dias de tratamento sugere um estado de equilíbrio na regulação do fluxo autofágico. As alterações observadas em diferentes tempos de tratamento destacam a importância de entender a

dinâmica temporal e as respostas específicas de cada proteína nas complexas vias de sinalização celular, especialmente em contextos de reparo de lesões teciduais.



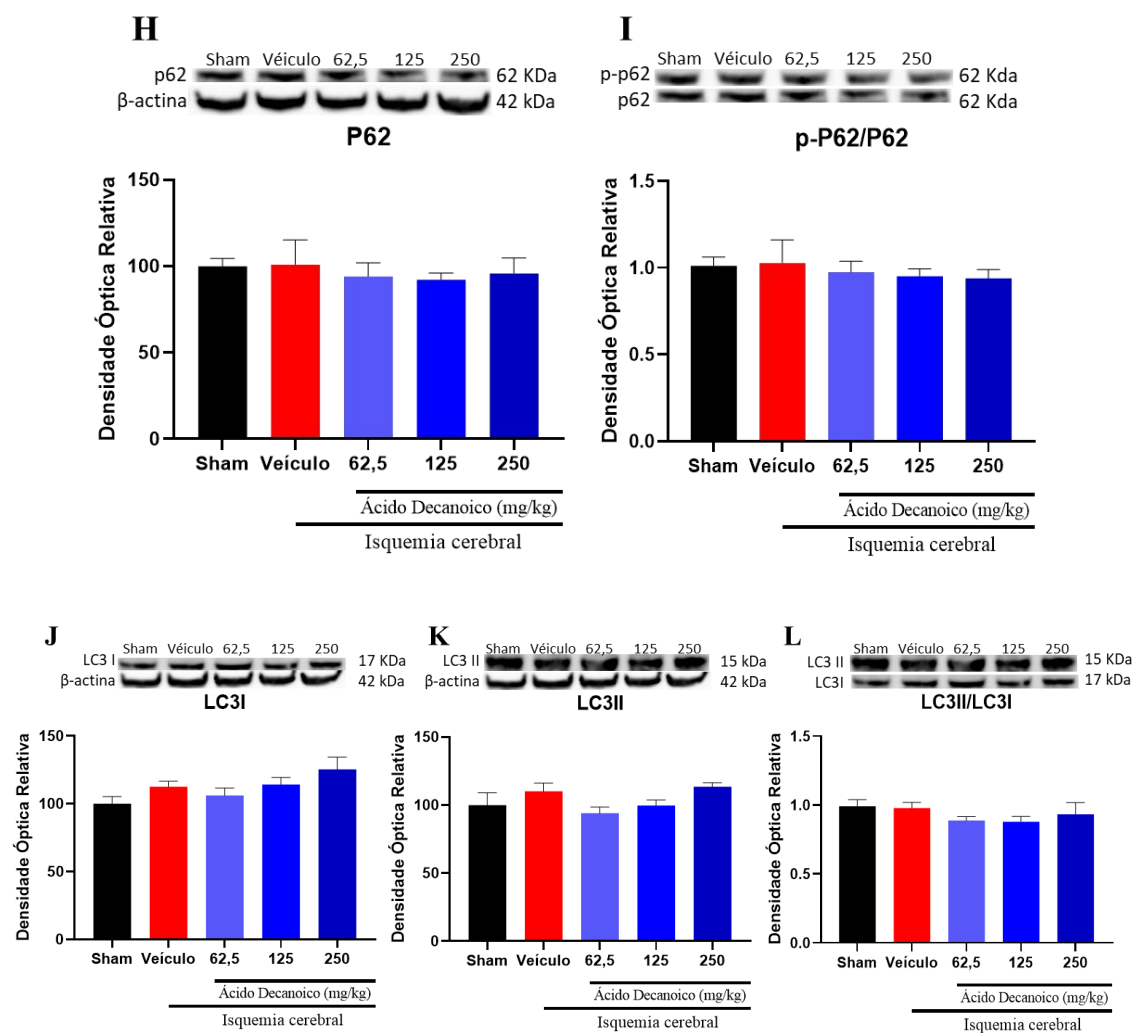


Figura 20. **Quantificação da concentração de proteínas envolvidas na via do mTOR e via da autofagia, após 14 dias de tratamento com ácido decanoico.** A. Expressão de mTOR. B. Concentrações de fosforilação de mTOR. C. Expressão do ULK 1. D. Concentrações de fosforilação do ULK 1. E. Expressão de Beclin 1. F. Concentrações de fosforilação de Bcl-2. G. Concentrações de fosforilação de Bcl-2. H. Expressão de p62. I. Concentrações de fosforilação de p62. J. Expressão do LC3 I. K. Expressão do LC3 II. L. Razão LC3I/CL3II. Dados estão sendo apresentados como média \pm Erro padrão de Média (\pm SEM), e foram analisados pelo teste One-way ANOVA, seguido por pós-teste de Dunnet. n = 6 animais por grupo.

7. Discussão

Para investigar o potencial neuroreparador do ácido decanoico, realizou-se um estudo utilizando o modelo de oclusão distal da artéria cerebral média (MCAO) em animais, a fim de induzir isquemia cerebral focal. O desenho experimental exigiu a padronização cuidadosa das doses e dos períodos de tratamento, representando um desafio característico em pesquisas farmacológicas. Assim, foram testadas cinco doses diferentes (62,5, 125, 250, 500, 1000 mg/kg), administradas durante dois intervalos de tempo, 7 e 14 dias, com o objetivo de identificar a dose mais eficaz e o período de tratamento ideal.

Durante este estudo, identificou-se um efeito de hormese, manifestado por uma relação dose-resposta bifásica: doses menores de ácido decanoico promoveram um efeito benéfico, enquanto doses maiores levaram à perda desses efeitos. Esta relação foi ilustrada por meio de uma curva em forma de "U", onde o eixo vertical indica a intensidade do efeito e o eixo horizontal, a dose administrada. Os resultados revelaram que, nas doses ótimas (62,5, 125, 250), o ácido decanoico proporcionou melhorias notáveis na função cognitiva e motora dos camundongos submetidos ao modelo MCAO, além de reduzir significativamente a extensão do infarto cerebral e a neuroinflamação.

Nesse estudo demonstrou-se que o tratamento com ácido decanoico durante 7 dias, especialmente nas doses de 250 e 500 mg/kg, promoveu uma diminuição na área da isquemia, sugerindo assim ter um efeito protetor contra o dano isquêmico, pois o animal modelo de MCAO apresentou uma extensa área de lesão quando comparado com grupo Sham. Além disso, houve uma redução significativas da área do infarto se comparado com animais tratados. O ácido decanoico se mostrou também como sendo efetivo para melhorar os défices motores dos animais submetidos a isquemia focal não só em 7 dias, mas também em 14 dias de tratamento, sendo possível observar nos comportamentos do teste de cilindro e *limb clasping*.

Estes achados alinham-se com a pesquisa de Sharma e colaboradores (2023), que documentou os efeitos protetores do ácido decanoico contra danos por isquemia e reperfusão em ratos. Este estudo revelou uma diminuição significativa na extensão da isquemia e uma melhoria notável na coordenação motora dos sujeitos experimentais (57). Em paralelo, Nakahima e colaboradores (2018) analisaram o potencial neuroreparador do

perampanel (PER), que, similarmente ao ácido decanoico, interfere na atividade dos receptores excitatórios AMPA. Este trabalho evidenciou que o PER reduziu significativamente os volumes de infarto e melhorou a função motora em modelos animais de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) (111). Ademais, investigações que empregaram modelos animais de isquemia cerebral focal e o uso de agentes como perampanel, aniracetam, talampanel, YM872, EGIS-8332, GYKI53405, e β -cariofileno, os quais inibem os receptores AMPA, demonstraram eficácia na atenuação de danos cerebrais resultantes de isquemia (56, 112-116), corroborando assim os resultados desta pesquisa. Além disso, estudos têm mostrado que os antagonistas dos receptores AMPA têm o potencial de prevenir danos neurológicos e auxiliar na recuperação após acidente vascular cerebral (AVC) em modelos animais. O ácido decanoico, especificamente, que é um ácido graxo de cadeia média, exibe um antagonismo não competitivo aos receptores AMPA, evidenciando seu potencial terapêutico (57).

O ácido decanoico também é um componente integral da dieta cetogênica (DC), uma dieta caracterizada pelo alto teor de gorduras benéficas, principalmente ácidos graxos de cadeia média, e baixo consumo de carboidratos. A dieta cetogênica tem sido associada a diversos benefícios para a saúde, incluindo melhorias na função cognitiva e redução do risco de doenças neurológicas e cardiovasculares (79). Embora os achados apresentados não sejam diretamente relacionados à DC, eles sugerem que o ácido decanoico, um AGCM presente na dieta, pode promover efeitos positivos na cognição, mobilidade e resposta anti-inflamatória, quando administrado em doses adequadas. Estes resultados indicam a influência de componentes da dieta cetogênica na recuperação motora e redução de lesões neuronais, observada tanto em modelos animais de isquemia cerebral (94, 95, 117), quanto na doença de Parkinson (91-93), e em estudos de outros ácidos graxos como neuroprotetores e neurorreparadores em modelos animais de isquemia cerebral (84-86).

Além da avaliação do comprometimento motor, buscamos investigar se a memória dos animais submetidos à isquemia foi impactada e se o tratamento com ácido decanoico teria o potencial de reverter os possíveis prejuízos.

Foram conduzidos alguns testes comportamentais, incluindo o teste de campo aberto, o teste de localização de objeto (OLT) e o teste de reconhecimento de novo objeto (NORT). Os resultados obtidos no teste de campo aberto não demonstraram diferenças

significativas entre os grupos tratados com ácido decanoico por 7 ou 14 dias, indicando que, neste teste específico, não foram observadas deficiências motoras nos animais, o que é uma vantagem significativa para a condução das análises de memória como o OLT e NORT, pois as diferenças observadas nos testes de memória são atribuíveis ao tratamento com ácido decanoico e não a possíveis disparidades motoras entre os grupos.

Os testes OLT e NORT sugeriram que o tratamento por 7 ou 14 dias com ácido decanoico pode ter efeitos positivos na memória espacial e contextual dos animais com isquemia cerebral. Observou-se uma diferença significativa nos resultados do OLT/NORT entre o grupo Sham e o grupo com o modelo de MCAO. Além disso, foi constatada uma diferença significativa entre o grupo MCAO e os grupos tratados com ácido decanoico em diferentes doses. Esses achados indicam que o tratamento com ácido decanoico pode melhorar a memória espacial, contextual e a plasticidade neuronal.

A melhora evidenciada na memória contextual e espacial estão em concordância com estudos anteriores que relataram achados semelhantes em modelos animais de doenças neurodegenerativas, como o de Nakahima e colaboradores. (2018), que utilizou o PER um inibidor dos receptores AMPA, mostrou suprimiu a neurodegeneração na zona limítrofe isquêmica cortical e melhorou significativamente a memória de trabalho espacial em modelo de isquemia focal (111), assim como, o β -cariofileno (BCP) demonstrou melhorar o comprometimento cognitivo em camundongos com AVC isquêmico agudo (116). E também trabalhos que investigaram o uso de grupos cetônicos da dieta cetogênica como a melhora no desempenho cognitivo e na plasticidade sináptica do hipocampo em modelos animais de doença de Alzheimer (88, 96). Um estudo de Taylor e colaboradores (2018) relatou que o uso de DC suplementado com triglicérides de cadeia média foi viável em participantes com doença de Alzheimer leve, e tiveram uma melhora na escala cognitiva dos pacientes (118).

Fundamentado nos resultados obtidos, também relatamos que o tratamento com ácido decanoico em um modelo de isquemia cerebral focal apresentou efeitos positivos em doses baixas. Portanto, foram realizadas mais pesquisas para elucidar os mecanismos subjacentes aos efeitos neuroreparadores do ácido decanoico no cérebro. E direcionou-se para a investigação de possíveis vias extracelulares e intracelulares, buscando como o ácido decanoico exerce sua influência no cérebro.

Para entender o mecanismo envolvido na neuroreparação induzida pelo tratamento com ácido decanoico no modelo de MCAO, foram analisadas citocinas pró-inflamatórias através da técnica de ELISA. Na isquemia cerebral, ocorre uma resposta inflamatória exacerbada, envolvendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), que são capazes de modular o tamanho do dano isquêmico no acidente vascular encefálico, exercendo efeitos neurotóxicos e a diminuição de sua ação demonstrou reduzir o dano cerebral isquêmico (119-122).

Os resultados revelaram um aumento expressivo nas concentrações de IL-1 β , IL-6 e TNF α no grupo modelo de MCAO em comparação com o grupo Sham, evidenciando uma resposta inflamatória exacerbada após a indução da isquemia cerebral. No entanto, com o tratamento com ácido decanoico após 7 dias de tratamento, resultou em uma significativa redução na concentração dessas citocinas, de forma dependente da dose administrada. Indicando efeitos anti-inflamatórios e auxiliando uma modulação eficaz da resposta inflamatória, o que pode contribuir para a proteção neuronal e a melhoria da função cerebral após a isquemia. Esses achados corroboram com estudos anteriores que relatam o ácido decanoico de modelo de isquemia e reperfusão (I/R), exerce efeitos significativos na modulação da resposta inflamatória, inibindo a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias em condições patológicas, como a isquemia cerebral (57). Da mesma forma, o ácido octanoico, um TGCM encontrado na DC, demonstrou suprimir a inflamação e potencialmente contribuir para a melhoria adicional da aterosclerose em camundongos deficientes em apoE (123), assim como, outras pesquisas investigando o efeito de suplementos de ácido decanoico com triglicerídeos de cadeia média também apontaram para efeitos anti-inflamatórios (124-126).

Subsequente a isso, foi analisado as proteínas do córtex pela técnica de Western blot, para buscar entender como o ácido decanoico atuaria em duas linhas de análise específicas: as vias dos receptores AMPA, devido ao fato do ácido decanoico, exibe um efeito de antagonismo não competitivo sobre o receptor AMPA e podendo contribuir na diminuição da excitotoxicidade causada pela isquemia e a via da autofagia, pois desempenha um papel na remoção seletiva de organelas danificadas, proteínas agregadas e outros componentes celulares disfuncionais, ajudando a mitigar os danos celulares causados pela isquemia (127, 128).

Com isso, avaliando as vias de expressão extracelular das proteínas de subunidades do receptor AMPA (GluR1, GluR2 e GluR3), com os resultados obtidos após um período de tratamento de 7 e 14 dias revelaram que a administração de ácido decanoico nas concentrações de 62,5, 125 e 250 mg/kg não promoveu alteração na composição de subunidades do receptor AMPA (GluR1, GluR2 e GluR3). Da mesma forma, investigações anteriores utilizando moléculas antagonistas do receptor de AMPA revelaram efeitos neuroreparadores em modelos de isquemia. No entanto, é importante ressaltar que esses efeitos não apresentaram correlação direta com a modulação e expressão dos receptores AMPA. (129-131). Este achado, embora inicialmente surpreendente, ressalta a complexidade das respostas biológicas, enfatizando a necessidade de considerar diferentes intervalos de tempo para uma compreensão abrangente dos efeitos do tratamento. Como por exemplo, um estudo conduzido por Mackowiak e colaboradores (2002) demonstrou que o LY451646, um potencializador do receptor AMPA, pode modular a expressão de determinadas proteínas de maneira dependente da dose, tempo de tratamento e da região do cérebro (132).

Visto que o mecanismo de ação parece não estar relacionado a alterações na expressão de receptores AMPA, decidimos analisar vias intracelulares. Inicialmente, focamos nossos esforços em vias relacionadas à autofagia, muito sensível às concentrações de carboidratos e lipídios nas células. A via do mTOR em condições favoráveis é uma importante cascata de sinalização celular que desempenha um papel central na regulação do crescimento celular, proliferação, sobrevivência, angiogênese e metabolismo. O mTOR também é regulado negativamente devido falta de nutrientes, a via é inibida, pela quinase AMP-activated protein kinase (AMPK) em resposta a condições de baixa energia celular. A ativação de AMPK inibe o mTOR, suprimindo a síntese de proteínas e promovendo a autofagia, um processo que ajuda a remover componentes celulares danificados (133-136).

A autofagia é essencial para a manutenção da homeostase celular, atuando como um mecanismo de "limpeza" e reciclagem. Ela permite que as células eliminem componentes danificados, como organelas envelhecidas e proteínas malformadas, fornecendo substratos reciclados para funções celulares. O equilíbrio na atividade autofágica é crucial, pois a deficiência contribui para doenças, enquanto o excesso prejudica a função celular. A regulação cuidadosa da autofagia é fundamental para a saúde e sobrevivência celular (65, 137). Acredita-se que a autofagia exerça um efeito

protetor no estresse energético agudo, mas a autofagia de longo prazo pode causar morte celular, ou seja, apoptose autofágica. A ativação da AMPK durante a isquemia pode inicialmente aumentar a oxidação de ácidos graxos para gerar ATP, mas a hipóxia prolongada pode direcionar os astrócitos a preferirem a glicólise como fonte de energia. Isso leva à acumulação de ácido láctico, que, juntamente com o aumento de cálcio intracelular, pode desencadear excitotoxicidade neuronal, prejudicando sua função (138).

Analisamos as proteínas relacionadas à autofagia, o que observamos foi que no tratamento por 7 dias, revelaram que não houve diferença significativa nas concentrações totais de mTOR nem em sua forma fosforilada entre os grupos analisados. Isso sugere que os tratamentos aplicados não afetaram diretamente a atividade global da via mTOR. Já na expressão de ULK 1, observamos uma diminuição nos grupos tratados em comparação com o grupo de animais sham. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas na forma fosforilada de ULK1 entre os grupos, indicando que a regulação da autofagia mediada por ULK1 pode não ter sido afetada pelos tratamentos. Além disso, avaliamos a expressão de Beclin1 e Bcl-2, duas proteínas essenciais na regulação da autofagia. Contrariamente às nossas expectativas, não observamos diferenças significativas na expressão dessas proteínas entre os grupos.

No que se refere ao fluxo autofágico após 7 dias de tratamento com o ácido decanoico, nossos resultados revelaram que não houve diferença significativa na via de p62, tanto nas concentrações totais quanto na sua forma fosforilada. Isso sugere que os tratamentos não afetaram a degradação seletiva de substratos autofágicos mediada por p62.

A proteína LC3B também foi utilizada nos nossos ensaios de fluxo autofágico, sendo detectada como duas bandas, LC3-I e LC3-II, após SDS-PAGE e imunoblotting. A LC3-II, conjugada com fosfatidiletanolamina (PE), está presente em membranas de autofagossomos, sendo correlacionada com o número dessas estruturas. Durante a estimulação curta da autofagia, a LC3-I diminui, e a LC3-II aumenta. Em estímulos mais prolongados, ambas desaparecem devido à degradação intralissossomal da LC3-II. Estudos mostram que os inibidores de protease lisossômica, como bafilomicina A1, parcialmente impedem a degradação de LC3-II, indicando que sua quantidade não reflete o fluxo autofágico total. Diferenças na quantidade de LC3-II com e sem inibidores são mais precisas para avaliar o fluxo autofágico (139).

Neste trabalho, tivemos um aumento da expressão da proteína LC3-II no grupo experimental e 62,5mg/kg em relação ao grupo MCAO, bem como um aumento na relação LC3-II/LC3-I na dose de 250mg/kg. Este resultado sugere uma ativação ou intensificação do processo de autofagia, onde a célula está aumentando sua capacidade de degradar e reciclar componentes danificados ou desnecessários para manter a homeostase celular. Esse resultado poderia indicar uma contribuição para o processo de neuroreparo do tecido gerado pelo tratamento com ácido decanoico, porém seu efeito foi limitado apenas à dose de 250 mg/kg. (140, 141).

Adicionalmente, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas proteínas relacionadas a mTOR e autofagia após 14 dias de tratamento. A ausência de variações significativas nessas proteínas específicas indica que o ácido decanoico administrado ao longo de 14 dias não teve um impacto mensurável na regulação da autofagia nesse ponto temporal. Esses resultados ressaltam a complexidade das respostas celulares e a necessidade de uma análise detalhada das diferentes fases temporais e dos mecanismos envolvidos na modulação das vias de sinalização celular. Uma possível explicação para a falta de efeitos observados após 14 dias de tratamento pode ser a adaptação das células ao composto ou a compensações em outras vias de sinalização que contrabalanceiam os efeitos do ácido decanoico na autofagia. Além disso, é importante considerar que a regulação da autofagia e de mTOR é altamente dinâmica e dependente de uma série de fatores intracelulares e extracelulares.

8. Conclusão

Com base nos resultados descritos, pode-se concluir que o tratamento durante 7 e 14 dias com o ácido decanoico por via oral apresentou uma redução na área isquêmica e uma melhora nos déficits de memória espacial, contextual e motora em camundongos submetidos ao modelo de MCAO, sendo a dose de 250mg/kg mais eficaz. A investigação dos mecanismos subjacentes revelou que o ácido decanoico ao longo de 7 dias de tratamento exerce efeitos anti-inflamatórios, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF α . Supreendentemente, o mecanismo de ação do ácido decanoico parece não estar relacionado a alterações na expressão de receptores AMPA nem na via de autofagia.

Por fim, os resultados obtidos fornecem evidências importantes sobre o potencial e limitações do ácido decanoico como uma abordagem terapêutica para o tratamento de lesões isquêmicas e para a melhoria da função cognitiva e motora. Essas descobertas podem contribuir para o avanço no campo do neuroreparo e abrir caminho para novas opções de tratamento que visam a recuperação funcional e cognitiva em pacientes afetados por eventos isquêmicos.

REFERÊNCIAS

1. Marques BL. Efeito neuroprotetor da sarcosina em modelo animal de isquemia cerebral focal. 2022.
2. Edwards JD, Kapral MK, Fang J, Swartz RH. Long-term morbidity and mortality in patients without early complications after stroke or transient ischemic attack. *Cmaj*. 2017;189(29):E954-E61.
3. Datta A, Sarmah D, Mounica L, Kaur H, Kesharwani R, Verma G, et al. Cell death pathways in ischemic stroke and targeted pharmacotherapy. *Translational Stroke Research*. 2020;11:1185-202.
4. Severiano DL, Oliveira-Lima OC, Vasconcelos GA, Marques BL, de Carvalho GA, Freitas EM, et al. Cerebral lipid dynamics in chronic cerebral hypoperfusion model by DESI-MS imaging. *Neuroscience*. 2020;426:1-12.
5. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors J, Culebras A, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(7):2064-89.
6. Ministério da Saúde. DATASUS. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). . acessor em 24/06/2023 ed2020.
7. Martins SCO, Sacks C, Hacke W, Brainin M, de Assis Figueiredo F, Pontes-Neto OM, et al. Priorities to reduce the burden of stroke in Latin American countries. *The Lancet Neurology*. 2019;18(7):674-83.
8. Salawu A, Green A, Crooks MG, Brixey N, Ross DH, Sivan M. A proposal for multidisciplinary tele-rehabilitation in the assessment and rehabilitation of COVID-19 survivors. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(13):4890.
9. Falcão IV, Carvalho EMFd, Barreto KML, Lessa FJD, Leite VMM. Acidente vascular cerebral precoce: implicações para adultos em idade produtiva atendidos pelo Sistema Único de Saúde. *Revista Brasileira de saúde materno infantil*. 2004;4:95-101.
10. Haupt M, Gerner ST, Bähr M, Doeppner TR. Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke—Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4334.
11. Zhu T, Wang L, Wang L-p, Wan Q. Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: Applications for natural compounds from medicinal herbs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;148:112719.
12. Royo J. Performances cognitives et neurogenèse au cours du vieillissement chez un primate non-humain: Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS; 2020.
13. Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium*. 2010;47(2):122-9.
14. Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(20):7609.
15. Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J. Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke. *Frontiers in immunology*. 2020;11:294.
16. Saver JL. Time is brain—quantified. *Stroke*. 2006;37(1):263-6.
17. Brouns R, De Deyn P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2009;111(6):483-95.
18. Pinto MCX, Mourão FAG, Binda NS, Leite HR, Gomez MV, Massensini AR, et al. Pharmacological induction of ischemic tolerance in hippocampal slices by sarcosine preconditioning. *Neurochemistry international*. 2012;61(5):713-20.

19. Hu H-J, Song M. Disrupted ionic homeostasis in ischemic stroke and new therapeutic targets. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*. 2017;26(12):2706-19.
20. Kelmanson IV, Shokhina AG, Kotova DA, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, et al. In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model. *Redox biology*. 2021;48:102178.
21. Pinto M, Simão F, da Costa F, Rosa D, de Paiva M, Resende R, et al. Sarcosine preconditioning induces ischemic tolerance against global cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2014;271:160-9.
22. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*. 2015;24(4):325.
23. Pauletti A, Terrone G, Shekh-Ahmad T, Salamone A, Ravizza T, Rizzi M, et al. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. Oxford University Press; 2019.
24. Wu L, Xiong X, Wu X, Ye Y, Jian Z, Zhi Z, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2020;13:28.
25. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *Journal of neuroinflammation*. 2019;16(1):1-24.
26. Dugue R, Nath M, Dugue A, Barone FC. Roles of pro-and anti-inflammatory cytokines in traumatic brain injury and acute ischemic stroke. *Mech Neuroinflamm*. 2017;211:4901.
27. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(5):779-89.
28. Stolp H. Neuropoietic cytokines in normal brain development and neurodevelopmental disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2013;53:63-8.
29. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology*. 2007;184(1-2):53-68.
30. Lai AY, Todd KG. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2006;84(1):49-59.
31. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2019;316(2):C135-C53.
32. Ramiro L, Simats A, García-Berrocoso T, Montaner J. Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2018;11:1756286418789340.
33. Cekanaviciute E, Fathali N, Doyle KP, Williams AM, Han J, Buckwalter MS. Astrocytic transforming growth factor-beta signaling reduces subacute neuroinflammation after stroke in mice. *Glia*. 2014;62(8):1227-40.
34. Doll DN, Barr TL, Simpkins JW. Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. *Aging and disease*. 2014;5(5):294.
35. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma P. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology*. 2013;698(1-3):6-18.
36. Ogita K, Okuda H, Yamamoto Y, Nishiyama N, Yoneda Y. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *Journal of neurochemistry*. 2003;85(5):1336-46.
37. Ge Y, Chen W, Axerio-Cilies P, Wang YT. NMDARs in cell survival and death: implications in stroke pathogenesis and treatment. *Trends in molecular medicine*. 2020;26(6):533-51.

38. Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crépel F, Rossier J. AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron*. 1992;9(2):247-58.
39. Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG. Structural and functional architecture of AMPA-type glutamate receptors and their auxiliary proteins. *Neuron*. 2017;94(4):713-30.
40. He X-Y, Li Y-J, Kalyanaraman C, Qiu L-L, Chen C, Xiao Q, et al. GluA1 signal peptide determines the spatial assembly of heteromeric AMPA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(38):E5645-E54.
41. Ai H, Yang W, Ye M, Lu W, Yao L, Luo J-h. Differential regulation of AMPA receptor GluA1 phosphorylation at serine 831 and 845 associated with activation of NMDA receptor subpopulations. *Neuroscience letters*. 2011;497(2):94-8.
42. Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(3):288-97.
43. Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 2007;54(6):859-71.
44. Gutierrez-Castellanos N, Da Silva-Matos CM, Zhou K, Canto CB, Renner MC, Koene LM, et al. Motor learning requires Purkinje cell synaptic potentiation through activation of AMPA-receptor subunit GluA3. *Neuron*. 2017;93(2):409-24.
45. Herguedas B, García-Nafría J, Cais O, Fernández-Leiro R, Krieger J, Ho H, et al. Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors. *Science*. 2016;352(6285):aad3873.
46. Rogawski MA. AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2013;127:9-18.
47. Chang EH, Savage MJ, Flood DG, Thomas JM, Levy RB, Mahadomrongkul V, et al. AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(9):3410-5.
48. Babaei P. NMDA and AMPA receptors dysregulation in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*. 2021;908:174310.
49. Noh K-M, Yokota H, Mashiko T, Castillo PE, Zukin RS, Bennett MV. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(34):12230-5.
50. Kanellopoulos GK, Xu XM, Hsu CY, Lu X, Sundt TM, Kouchoukos NT. White matter injury in spinal cord ischemia: protection by AMPA/kainate glutamate receptor antagonism. *Stroke*. 2000;31(8):1945-52.
51. Guo C, Ma Y-Y. Calcium permeable-AMPA receptors and excitotoxicity in neurological disorders. *Frontiers in Neural Circuits*. 2021;15:711564.
52. Goodwani S, Saternos H, Alasmari F, Sari Y. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2017;77:14-31.
53. Rueda CB, Llorente-Folch I, Traba J, Amigo I, Gonzalez-Sanchez P, Contreras L, et al. Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺-activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2016;1857(8):1158-66.
54. Akins PT, Atkinson RP. Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Current Medical Research and Opinion*. 2002;18(sup2):s9-s13.

55. Zou S, Li L, Pei L, Vukusic B, Van Tol HH, Lee FJ, et al. Protein-protein coupling/uncoupling enables dopamine D2 receptor regulation of AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(17):4385-95.
56. Sharma H, Reeta K, Sharma U, Suri V, Singh S. AMPA receptor modulation through sequential treatment with perampanel and aniracetam mitigates post-stroke damage in experimental model of ischemic stroke. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2023:1-17.
57. Sharma H, Reeta K, Sharma U, Suri V. Decanoic acid mitigates ischemia reperfusion injury by modulating neuroprotective, inflammatory and oxidative pathways in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2023;32(8):107184.
58. Pinto MCX. Efeito neuroprotetor da inibição do transportador de glicina do tipo 1. 2014.
59. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010;330(6009):1344-8.
60. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Molecular and cellular biochemistry*. 2004;263:55-72.
61. Vidoni C, Fuzimoto A, Ferraresi A, Isidoro C. Targeting autophagy with natural products to prevent SARS-CoV-2 infection. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2022;12(1):55-68.
62. Fu L, Huang L, Cao C, Yin Q, Liu J. Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy. *Brain Research*. 2016;1650:103-11.
63. Dai S-H, Chen T, Li X, Yue K-Y, Luo P, Yang L-K, et al. Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: involvement of the AMPK-mTOR pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;108:345-53.
64. Shen P, Hou S, Zhu M, Zhao M, Ouyang Y, Feng J. Cortical spreading depression preconditioning mediates neuroprotection against ischemic stroke by inducing AMP-activated protein kinase-dependent autophagy in a rat cerebral ischemic/reperfusion injury model. *Journal of neurochemistry*. 2017;140(5):799-813.
65. Kim YC, Guan K-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(1):25-32.
66. Tian W, Li W, Chen Y, Yan Z, Huang X, Zhuang H, et al. Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy. *FEBS letters*. 2015;589(15):1847-54.
67. Hwang J-Y, Gertner M, Pontarelli F, Court-Vazquez B, Bennett MVL, Ofengeim D, et al. Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die. *Cell Death & Differentiation*. 2017;24(2):317-29.
68. Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(2):992-8.
69. Tassa A, Roux MP, Attaix D, Bechet DM. Class III phosphoinositide 3-kinase-Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochemical Journal*. 2003;376(3):577-86.
70. Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Molecular cell*. 2015;57(3):456-66.
71. Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell structure and function*. 2002;27(6):431-41.

72. Jiang WW, Huang BS, Han Y, Deng LH, Wu LX. Sodium hydrosulfide attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing overactivated autophagy in rats. *FEBS Open Bio*. 2017;7(11):1686-95.
73. Wen Y-D, Sheng R, Zhang L-S, Han R, Zhang X, Zhang X-D, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy*. 2008;4(6):762-9.
74. Baek S-H, Noh AR, Kim K-A, Akram M, Shin Y-J, Kim E-S, et al. Modulation of mitochondrial function and autophagy mediates carnosine neuroprotection against ischemic brain damage. *Stroke*. 2014;45(8):2438-43.
75. Wang P, Xu T-Y, Wei K, Guan Y-F, Wang X, Xu H, et al. ARRB1/ β -arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1-dependent autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy*. 2014;10(9):1535-48.
76. Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, Periyasamy-Thandavan S, Barrett JR, Kirks R, et al. Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Experimental & translational stroke medicine*. 2014;6(1):1-9.
77. Yang H, Shan W, Zhu F, Wu J, Wang Q. Ketone bodies in neurological diseases: focus on neuroprotection and underlying mechanisms. *Frontiers in neurology*. 2019;10:585.
78. Koh S, Dupuis N, Auvin S. Ketogenic diet and neuroinflammation. *Epilepsy Research*. 2020;167:106454.
79. Gough SM, Casella A, Ortega KJ, Hackam AS. Neuroprotection by the ketogenic diet: evidence and controversies. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8:782657.
80. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, et al. A randomized trial of classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets in the treatment of childhood epilepsy. *Epilepsia*. 2009;50(5):1109-17.
81. Huttenlocher P, Wilbourn A, Signore J. Medium-chain triglycerides as a therapy for intractable childhood epilepsy. *Neurology*. 1971;21(11):1097-103.
82. Calon F, Cole G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2007;77(5-6):287-93.
83. Lewis MD, Bailes J. Neuroprotection for the warrior: dietary supplementation with omega-3 fatty acids. *Military medicine*. 2011;176(10):1120-7.
84. Zhou C, Li C, Yu HM, Zhang F, Han D, Zhang GY. Neuroprotection of γ -aminobutyric acid receptor agonists via enhancing neuronal nitric oxide synthase (Ser847) phosphorylation through increased neuronal nitric oxide synthase and PSD95 interaction and inhibited protein phosphatase activity in cerebral ischemia. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(13):2973-83.
85. Zhang W, Liu J, Hu X, Li P, Leak RK, Gao Y, et al. n-3 polyunsaturated fatty acids reduce neonatal hypoxic/ischemic brain injury by promoting phosphatidylserine formation and Akt signaling. *Stroke*. 2015;46(10):2943-50.
86. Jiang X, Suenaga J, Pu H, Wei Z, Smith AD, Hu X, et al. Post-stroke administration of omega-3 polyunsaturated fatty acids promotes neurovascular restoration after ischemic stroke in mice: efficacy declines with aging. *Neurobiology of disease*. 2019;126:62-75.
87. Yao J, Chen S, Mao Z, Cadenas E, Brinton RD. 2-Deoxy-D-glucose treatment induces ketogenesis, sustains mitochondrial function, and reduces pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one*. 2011;6(7):e21788.

88. Yin JX, Maalouf M, Han P, Zhao M, Gao M, Dharshaun T, et al. Ketones block amyloid entry and improve cognition in an Alzheimer's model. *Neurobiology of aging*. 2016;39:25-37.
89. Pawlosky RJ, Kemper MF, Kashiwaya Y, King MT, Mattson MP, Veech RL. Effects of a dietary ketone ester on hippocampal glycolytic and tricarboxylic acid cycle intermediates and amino acids in a 3xTg AD mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2017;141(2):195-207.
90. Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, et al. The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology*. 2008;7(6):500-6.
91. Cheng B, Yang X, An L, Gao B, Liu X, Liu S. Ketogenic diet protects dopaminergic neurons against 6-OHDA neurotoxicity via up-regulating glutathione in a rat model of Parkinson's disease. *Brain research*. 2009;1286:25-31.
92. Yang X, Cheng B. Neuroprotective and anti-inflammatory activities of ketogenic diet on MPTP-induced neurotoxicity. *Journal of molecular neuroscience*. 2010;42:145-53.
93. Tieu K, Perier C, Caspersen C, Teismann P, Wu D-C, Yan S-D, et al. D- β -Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(6):892-901.
94. Tai K-K, Nguyen N, Pham L, Truong D. Ketogenic diet prevents cardiac arrest-induced cerebral ischemic neurodegeneration. *Journal of Neural Transmission*. 2008;115:1011-7.
95. Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, Mori S, Sato K, Dohi S, et al. β -hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 2002;89(1):36-43.
96. Krikorian R, Shidler MD, Dangelo K, Couch SC, Benoit SC, Clegg DJ. Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging*. 2012;33(2):425. e19-. e27.
97. Krikorian R, Shidler MD, Summer SS, Sullivan PG, Duker AP, Isaacson RS, et al. Nutritional ketosis for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: a controlled pilot trial. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders*. 2019;1:41-7.
98. Hartman AL, Gasior M, Vining EP, Rogawski MA. The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatric neurology*. 2007;36(5):281-92.
99. Damiano F, De Benedetto GE, Longo S, Giannotti L, Fico D, Siculella L, et al. Decanoic acid and not octanoic acid stimulates fatty acid synthesis in U87MG glioblastoma cells: a metabolomics study. *Frontiers in Neuroscience*. 2020;14:783.
100. Chang P, Augustin K, Boddum K, Williams S, Sun M, Terschak JA, et al. Seizure control by decanoic acid through direct AMPA receptor inhibition. *Brain*. 2016;139(2):431-43.
101. Augustin K, Williams S, Cunningham M, Devlin AM, Friedrich M, Jayasekera A, et al. Perampanel and decanoic acid show synergistic action against AMPA receptors and seizures. *Epilepsia*. 2018;59(11):e172-e8.
102. Newman JC, Verdin E. β -Hydroxybutyrate: a signaling metabolite. *Annual review of nutrition*. 2017;37:51-76.
103. Fernando WMADB, Martins IJ, Goozee K, Brennan CS, Jayasena V, Martins RN. The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. *British Journal of Nutrition*. 2015;114(1):1-14.

104. Wlaż P, Socała K, Nieoczym D, Żarnowski T, Żarnowska I, Czuczwar SJ, et al. Acute anticonvulsant effects of capric acid in seizure tests in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2015;57:110-6.
105. Wayman C, Duricki DA, Roy LA, Haenzi B, Tsai S-Y, Kartje G, et al. Performing permanent distal middle cerebral with common carotid artery occlusion in aged rats to study cortical ischemia with sustained disability. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2016(108):e53106.
106. Joshi CN, Jain SK, Murthy PSR. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain research protocols*. 2004;13(1):11-7.
107. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000;39(5):777-87.
108. Miedel CJ, Patton JM, Miedel AN, Miedel ES, Levenson JM. Assessment of spontaneous alternation, novel object recognition and limb claspings in transgenic mouse models of amyloid- β and tau neuropathology. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2017(123).
109. Murtishaw AS, Heaney CF, Bolton MM, Belmonte KCD, Langhardt MA, Kinney JW. Intermittent streptozotocin administration induces behavioral and pathological features relevant to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neuropharmacology*. 2018;137:164-77.
110. Denninger JK, Smith BM, Kirby ED. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2018(141):e58593.
111. Nakajima M, Suda S, Sowa K, Sakamoto Y, Nito C, Nishiyama Y, et al. AMPA receptor antagonist perampanel ameliorates post-stroke functional and cognitive impairments. *Neuroscience*. 2018;386:256-64.
112. Lo EH, Pierce AR, Mandeville JB, Rosen BR. Neuroprotection with NBQX in rat focal cerebral ischemia: effects on ADC probability distribution functions and diffusion-perfusion relationships. *Stroke*. 1997;28(2):439-47.
113. Takahashi M, Kohara A, Shishikura Ji, Kawasaki-Yatsugi S, Ni JW, Yatsugi Si, et al. YM872: A Selective, Potent and Highly Water-Soluble α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptor Antagonist. *CNS drug reviews*. 2002;8(4):337-52.
114. Matucz É, Móricz K, Gigler G, Simó A, Barkóczy J, Lévy G, et al. Reduction of cerebral infarct size by non-competitive AMPA antagonists in rats subjected to permanent and transient focal ischemia. *Brain research*. 2004;1019(1-2):210-6.
115. Erdő F, Berzsenyi P, Németh L, András F. Talampanel improves the functional deficit after transient focal cerebral ischemia in rats. A 30-day follow up study. *Brain research bulletin*. 2006;68(4):269-76.
116. Chen S, Wang Y, Wang X, He M, Zhang L, Dong Z. PKA-Dependent Membrane Surface Recruitment of CI-AMPA Receptors Is Crucial for BCP-Mediated Protection Against Post-acute Ischemic Stroke Cognitive Impairment. *Frontiers in Neurology*. 2020;11:566067.
117. Streijger F, Plunet WT, Lee JH, Liu J, Lam CK, Park S, et al. Ketogenic diet improves forelimb motor function after spinal cord injury in rodents. *PloS one*. 2013;8(11):e78765.
118. Taylor MK, Sullivan DK, Mahnken JD, Burns JM, Swerdlow RH. Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. 2018;4:28-36.

119. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(8):629-40.
120. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*. 2008;5(1):1-13.
121. Loddick SA, Rothwell NJ. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *Journal of cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1996;16(5):932-40.
122. Mulcahy NJ, Ross J, Rothwell NJ, Loddick SA. Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischaemia in the rat. *British journal of pharmacology*. 2003;140(3):471-6.
123. Zhang X, Xue C, Xu Q, Zhang Y, Li H, Li F, et al. Caprylic acid suppresses inflammation via TLR4/NF- κ B signaling and improves atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nutrition & metabolism*. 2019;16:1-16.
124. Ruskin DN, Kawamura Jr M, Masino SA. Reduced pain and inflammation in juvenile and adult rats fed a ketogenic diet. *PloS one*. 2009;4(12):e8349.
125. Dupuis N, Curatolo N, Benoist JF, Auvin S. Ketogenic diet exhibits anti-inflammatory properties. *Epilepsia*. 2015;56(7):e95-e8.
126. Jeong EA, Jeon BT, Shin HJ, Kim N, Lee DH, Kim HJ, et al. Ketogenic diet-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation decreases neuroinflammation in the mouse hippocampus after kainic acid-induced seizures. *Experimental neurology*. 2011;232(2):195-202.
127. Ceprian M, Fulton D. Glial cell AMPA receptors in nervous system health, injury and disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(10):2450.
128. Kirdajova DB, Kriska J, Tureckova J, Anderova M. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells, *Front. Cell. Neurosci*. 14 (2020) 51. 2020.
129. O'Neill MJ, Bond A, Ornstein PL, Ward MA, Hicks CA, Hoo K, et al. Decahydroisoquinolines: novel competitive AMPA/kainate antagonists with neuroprotective effects in global cerebral ischaemia. *Neuropharmacology*. 1998;37(10-11):1211-22.
130. Menniti FS, Buchan AM, Chenard BL, Critchett DJ, Ganong AH, Guanowsky V, et al. CP-465,022, a selective noncompetitive AMPA receptor antagonist, blocks AMPA receptors but is not neuroprotective in vivo. *Stroke*. 2003;34(1):171-6.
131. Kapus G, Kertész S, Gigler G, Simó A, Vegh M, Barkóczy J, et al. Comparison of the AMPA antagonist action of new 2, 3-benzodiazepines in vitro and their neuroprotective effects in vivo. *Pharmaceutical research*. 2004;21:317-23.
132. Mackowiak M, O'Neill MJ, Hicks CA, Bleakman D, Skolnick P. An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an in vivo study. *Neuropharmacology*. 2002;43(1):1-10.
133. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *cell*. 2012;149(2):274-93.
134. Jewell JL, Russell RC, Guan K-L. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(3):133-9.
135. Inoki K, Guan K-L. Complexity of the TOR signaling network. *Trends in cell biology*. 2006;16(4):206-12.
136. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*. 2008;30(2):214-26.

137. Eskelinen E-L, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2009;1793(4):664-73.
138. Rousset CI, Leiper FC, Kichev A, Gressens P, Carling D, Hagberg H, et al. A dual role for AMP-activated protein kinase (AMPK) during neonatal hypoxic–ischaemic brain injury in mice. *Journal of Neurochemistry*. 2015;133(2):242-52.
139. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542-5.
140. Clarke PG, Puyal J. *Autophagic cell death exists*. Taylor & Francis; 2012. p. 867-9.
141. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(12):1004-10.

APENDECE I

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito **neuroprotetor do ácido** decanoico em modelo **animal de isquemia cerebral**", registrada com o protocolo nº 048/23 sob a responsabilidade de **Antonio Italo dos Santos Nunes e Mauro Cunha Xavier Pinto** 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **31/07/2023**

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 31/07/2023 a 31/07/2028
- Espécie/linhagem/raça: Camundongos Swiss
- N° de animais autorizados: 420
- Peso/Idade: 30 a 50 gramas. 8 a 10 semanas Sexo:
- machos
- Instalação onde serão mantidos os animais: Biotério DCIF/DFAR e Biotério do Neurolab Origem (fornecedor):
- Biotério Central da Universidade Federal de Goiás-UFG

Documento assinado digitalmente
gov.br ELIZABETH PEREIRA MENDES
Data: 03/08/2023 08:49:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Elizabeth Pereira Mendes Coordenadora da
CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia — Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com