



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Tese de Doutorado
**ALTERAÇÕES METABÓLICAS RELACIONADAS À EXCITOTOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA EM UM MODELO EXPERIMENTAL
DE ISQUEMIA CEREBRAL**

Yasmine Nonose

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Nonose, Yasmine
ALTERAÇÕES METABÓLICAS RELACIONADAS À
EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL / Yasmine Nonose. --
2020.

161 f.

Orientador: Adriano Martimbianco de Assis.

Coorientador: Diogo Onofre Gomes de Souza.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Isquemia Cerebral. 2. Oclusão Permanente. 3.
Metabolismo Energético Cerebral. 4. Glutamato. 5.
Ceftriaxona. I. Martimbianco de Assis, Adriano,
orient. II. Gomes de Souza, Diogo Onofre, coorient.
III. Título.

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS RELACIONADAS À EXCITOTOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA EM UM MODELO EXPERIMENTAL
DE ISQUEMIA CEREBRAL**

Aluna: Yasmine Nonose, MSc

Orientador: Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Porto Alegre

2020

Everything we hear is an opinion, not a fact.

Everything we see is a perspective, not the truth.

Tudo que ouvimos é uma opinião, não um fato.
Tudo que vemos é uma perspectiva, não a verdade.

(Frase atribuída a) Marcus Aurelius.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a oportunidade que tive em cursar o doutorado. Foi um período que me possibilitou exercer uma responsabilidade enorme sobre a concepção e o andamento de um projeto científico, o que me fez evoluir muito, pessoal e profissionalmente. Ao longo desses quatro anos, muitos imprevistos aconteceram e, quando não podemos mudar as circunstâncias em que nos encontramos, temos que mudar a nós mesmos.

Dito isso, a conclusão desta Tese não teria sido possível sem o apoio, a confiança e a dedicação que recebi de diversas pessoas.

Em primeiro lugar, agradeço à minha família por sempre incentivar meus estudos e por acreditar no meu potencial. Meus pais fizeram inúmeros sacrifícios para que eu pudesse estudar e para que eu usasse meu conhecimento para ir além, algo que, com certeza, me sinto mais preparada para fazer hoje por causa deles. Agradeço ao meu pai por ser uma fonte infinita de paciência e por acompanhar este trabalho em todos os momentos, trazendo muita positividade com seu jeito leve de ver a vida. À minha mãe, agradeço imensamente por me ouvir nos momentos mais difíceis e por me mostrar que a vida vai muito além do doutorado, sendo uma fonte inesgotável de determinação e força, nas quais eu me inspiro continuamente.

Agradeço aos meus orientadores por todos os aprendizados e oportunidades que me proporcionaram. Agradeço ao Prof. Adriano pela orientação na primeira etapa de elaboração desta tese. Agradeço ao Prof. Diogo Souza por todo auxílio prestado na segunda etapa do meu doutorado. Sua visão científica e análise de resultados me mostraram o quanto eu ainda poderia aprender, sendo esse período que passamos juntos muito proveitoso. Agradeço também ao meu orientador externo, Prof. Luc Pellerin, que me acolheu durante meu período de Doutorado Sanduíche e compartilhou seus conhecimentos, seus recursos e seu tempo de forma tão generosa.

Às colegas e grandes amigas Andressa e Jussemara por toda a cumplicidade, companheirismo e amizade. A presença de vocês foi fundamental

para a execução e a finalização deste trabalho, tanto pelo carinho e generosidade, quanto pelos incentivos e ensinamentos trocados. Andressa, com seus planejamentos impecáveis, e Jusse, com sua determinação de aprender sempre mais e melhor, vocês são a equipe perfeita. Obrigada por acreditarem em mim e por me apoiarem tão desmedidamente como vocês fizeram.

Aos colegas do laboratório 28 pela convivência, pela solidariedade e contribuições científicas. Agradeço em especial às colegas Fran, Fernanda, Lets, Pâmela e Kamila (lab. 24), Mari Ilha (lab. 21) e Pauline (lab. 23), que sempre estiveram dispostas a me ajudar em momentos de dificuldade, seja com uma palavra de encorajamento ou com conhecimento técnico, que elas todas têm de sobra. Agradeço também ao colega e amigo Roberto por ter me ajudado quando mais precisei e por ser um excelente parceiro de experimentos, sempre com um sorriso e uma felicidade contagiante. Agradeço especialmente a dedicação da Dra. Débora Guerini na reta final deste trabalho, que foi extremamente proveitosa e contribuiu enormemente para meu crescimento profissional.

Aos alunos de iniciação científica, agradeço pelo comprometimento, pela dedicação e por me darem a oportunidade de aprender cada vez mais e melhor. Agradeço em especial os alunos Rodrigo Apel, Rodrigo Gonçalves, Thaís Martins e Stéfani Malet que participaram ativamente deste trabalho. Foi um prazer orientar cada um de vocês.

Aos meus colegas do Grupo Pellerin na Universidade de Lausanne, Cédrine, Citlalli, Anna, Chris, Charlotte, Nadège e Cathy, por todo auxílio, trocas de conhecimento e parceria, e aos amigos do Departamento de Fisiologia Alessandro, Daniel, Carolina, David, Sofia, Valentina e Zosia pelo companheirismo e pela amizade em todos os momentos. Obrigada por fazerem minha breve estadia ser tão divertida e prazerosa.

Ao Prof Carlos Alexandre Netto e aos colegas do laboratório 35, que me acolheram não somente para o grupo de seminários, mas que me proporcionaram bons momentos de amizade e de troca de conhecimentos. Agradeço em especial ao amigo Dr. Eduardo Sanches por ter dividido seu tempo e conhecimento tão generosamente, por ter uma simpatia inabalável e aceitar discutir minhas ideias de maneira tão receptiva.

Aos pesquisadores do Instituto do Cérebro da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (InsCer – PUCRS) Dra Gianina Venturini e Dr. Samuel Greggio por seu empenho e dedicação na obtenção das imagens em PET *scan*, por serem grandes amigos e excelentes profissionais.

Agradeço às mulheres que me incentivaram a continuar meu envolvimento em pesquisa científica, em especial à Prof. Magdolna Maria Vozári-Hampe (*in memorian*), à Prof. Iraci Lucena da Silva Torres, e à minha eterna doutoranda Dra. Joanna Ripoll Rozisky. Obrigada por acreditarem em mim e por todos os ensinamentos.

Agradeço aos meus amigos do coração Fernanda, Ramiro, Márcio, Letícia, e à toda a galera do Acampamento de Ano Novo por se interessarem em “como vai o doutorado”, e por aguentarem a resposta para essa fatídica pergunta todas as vezes. Obrigada por me acolherem sempre que passei por momentos difíceis, por comemorarem comigo as pequenas e grandes vitórias, e por serem as melhores companhias que alguém poderia querer.

Agradeço ao quadro de funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS. À secretaria do PPG, na qual todos me ajudaram em diversos momentos, especialmente Cléia e Giordano; ao pessoal da portaria, especialmente Silvana, Rodrigo e Gilca por serem pessoas maravilhosas que sempre tornaram o Departamento mais acolhedor.

Agradeço, por fim, à bolsa concedida pelo CNPq e pela CAPES. Sem o auxílio, teria sido impossível minha dedicação ao desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

PARTE I	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Isquemia Cerebral	2
1.1.1. Patofisiologia da Lesão Isquêmica.	3
1.1.2. Zona de Penumbra como alvo terapêutico	4
1.1.3. Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral	5
1.2. Sistema Glutamatérgico	6
1.2.1. Excitotoxicidade e Neuroproteção	7
1.2.2. Glutamato como intermediário metabólico	8
1.3. Metabolismo Energético Cerebral	10
1.3.1. A glicose está no centro do metabolismo cerebral	11
1.3.2. O Lactato como substrato energético alternativo	12
1.3.3. Acoplamento neurometabólico	14
1.4. Astroglia e Reatividade Astrocitária	16
1.5. Pré-condicionamento à Isquemia Cerebral	19
1.5.1. Indução da Tolerância à Isquemia Cerebral	20
1.5.2. Mecanismos envolvidos no PC	22
1.6. Hipótese de Trabalho	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
PARTE II	
3. RESULTADOS	30
3.1. CAPÍTULO 1	31
3.2. CAPÍTULO 2	34
PARTE III	
4. DISCUSSÃO	82

4.1.	Caracterização das alterações neuroquímicas e comportamentais no modelo experimental de FPI	84
4.2.	Determinação da região afetada no modelo de FPI	86
4.3.	Reatividade astrocitária no modelo de FPI	87
4.4.	Alterações bilaterais em um modelo de dano isquêmico focal	89
4.5.	Influência de citocinas e fatores tróficos nos transportadores	90
4.6.	Expressão de mRNA e atividade de GLAST e GLT-1 após indução de FPI	92
4.7.	Alterações interhemisférios envolvendo glutamato e lactato	93
4.8.	Expressão dos transportadores MCT	96
4.9.	O CTXpre teve efeito na captação de glutamato por um mecanismo indireto no modelo de FPI	98
4.10.	Análise da performance comportamental demonstra efeitos neuroprotetores do CTXpre	98
4.11.	A regulação da expressão de GLT-1 pós-IC pode depender de reperfusão	100
4.12.	A atividade de GLT-1 pode ser potencializada pela reação da GS	101
4.13.	Aumento persistente da taxa oxidativa de glutamato no grupo ICTX	102
4.14.	Análise de aminoácidos sugere maior atividade glicolítica	103
4.15.	Níveis de aspartato apontam para oxidação do glutamato no compartimento neuronal no grupo ICTX	104
4.16.	A liberação de glutamato em preparação sinaptossomal	105
4.17.	Efeitos da FPI e do CTXpre no metabolismo de valina e triptofano	106
5.	CONCLUSÃO & PERSPECTIVAS	110
6.	ADENDOS	113
6.1.	Carta de Aprovação do Comitê de Ética	114
6.2.	Comprovação de Participação em outras publicações	116

6.3. Instruções para autores da Revista Científica <i>Stroke</i>	117
7. REFERÊNCIAS	130

PARTE I

LISTA DE ABREVIATURAS

4-CN: α -ciano-4-hidróxicinamato
 ^{18}F : Flúor-18
[^{18}F]FDG: ^{18}F -Fluordesoxiglicose
3-NP: *3-Nitropropionic Acid*, Ácido 3-Nitropropiônico
AMPA: Receptor de Ácido-amono-3-hidróxi-5-metil-isoxazol-4-propiônico
AMP: Monofosfato de Adenosina
AMPK: *AMP-activated kinase*, proteína cinase ativada por AMP
ANOVA: Análise de variância
ATP: Trifosfato de adenosina
AVE: Acidente vascular encefálico
BCAA: *Branched chain amino acids*, aminoácidos de cadeia ramificada
BHE: Barreira Hematoencefálica
CAG: Carreador de Aspartato/Glutamato
DP: Desvio Padrão
EAAT: *Excitatory Amino Acid Transporter*, transportadores de aminoácidos excitatórios
FPI: *Focal Permanent Ischemia*, isquemia focal permanente
GDH: glutamato desidrogenase
GEE: Equações de Estimacões Generalizadas
GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*, proteína glial fibrilar ácida
GLAST: *Glutamate-Aspartate Transporter*, transportador de glutamato-aspartato
GLT-1: *Glutamate Transporter 1*, transportador de glutamato 1
GLUT: Transportadores de Glicose
GS: Glutamina Sintetase
GSH: Glutaciona reduzida
HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*, solução salina balanceada de Hank.
HIF-1: *Hypoxia-inducible factor 1*, fator induzido por hipóxia 1
HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
IC: Isquemia Cerebral
IL-1 β : Interleucina 1-beta
IPC: *Ischemic preconditioning*, pré-condicionamento por isquemia
IT: *Ischemic Tolerance*, tolerância à isquemia
Km: Constante de Michaelis-Menten
LCR: Líquido Cefalorraquidiano
MCAO: *Middle Cerebral Artery Occlusion*, oclusão da artéria cerebral média
MCT: *Monocarboxylic Acid Transporter*, transportador de ácidos monocarboxílicos

ME: *Malic enzyme*, enzima málica
mRNA: *Messenger Ribonucleic Acid*, ácido ribonucleico mensageiro
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Na⁺/K⁺ ATPase: sódio-potássio ATPase
NMDAR: Receptor de N-metil-D-aspartato
OPA: orto-ftalaldeído
PBS: *Phosphate Buffered Saline*, tampão fosfato salino
PC: *Preconditioning*, pré-condicionamento
PET: *Positron Emission Tomography*, Tomografia por Emissão de Pósitrons
RNA: *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucleico
RT-PCRq: *Real Time – quantitative Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real.
SEM: *Standard Error Deviation*, Erro Padrão da Média
SNC: Sistema Nervoso Central
SOD: Superóxido Dismutase
SUV: *Standard Uptake Value*, Valor de Captação Padrão
TFB-TBOA: ((2S,3S)-3-{3-[4-(trifluorometil) benzoilamina] benzilóxi} aspartato)
TCA: *Tricarboxylic acid*, ácido tricarboxílico
tMCAO: oclusão da artéria cerebral média transitória
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa
TTC: cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
V_{max}: velocidade da reação quando a enzima está completamente saturada de substrato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação diagramática dos principais mecanismos patofisiológicos que levam ao dano cerebral permanente na IC	4
Figura 2. Representação esquemática do glutamato e sua participação no metabolismo intermediário cerebral	10
Figura 3. Representação do papel central da glicose no metabolismo cerebral.....	12
Figura 4. Representação esquemática do acoplamento metabólico entre astrócitos e neurônios	16
Figura 5. Ilustração das funções desempenhadas pelos astrócitos na homeostase do SNC e na patofisiologia da IC	18
Figura 6. Diagrama representando as janelas transientes de tolerância à IC em relação à intervenção pré-condicionante	20
Figura 7. Representação das áreas corticais de interesse	24
Figura 8. Esquema representando os diferentes desenhos experimentais utilizados na presente tese	28
Figura 9. Mecanismo sugerido para explicar a relação metabólica glutamato-lactato observada simultaneamente em ambos os hemisférios cerebrais 2 dias pós-FPI	95
Figura 10. Representação da hipótese de que a oxidação de glutamato aconteceria majoritariamente no compartimento neuronal	108
Figura 11. Resumo gráfico dos resultados obtidos no Capítulo 1 e 2 desta tese	109

CAPÍTULO 1

(Publicado no periódico científico *Molecular Neurobiology*)

DOI: 10.1007/s12035-017-0458-x

CAPÍTULO 2

Figure 1. Experimental design and long-term behavior assessment70

Figure 2. CTXpre primary effects on infarct volume71

Figure 3. Effects of FPI and CTXpre on glutamate uptake and release 2 days post-FPI	72
Figure 4. Effects of FPI and CTXpre on substrates oxidation to CO ₂ 2 days post-FPI	73
Figure 5. FPI and CTXpre effects on metabolic pathways involving glutamate handling 2 days post-FPI	74
Figure 6. Both FPI and CTXpre altered amino acid levels in the CSF 2 days after injury	75
Figure 7. Summary of FPI injury and CTXpre alterations in cortical neurochemistry 2 days post-FPI	76
Figure S1. Uptake of L-[³ H]-Glutamate in synaptosomes	77
Figure S2. Total exploration time in NORT (42 days post-FPI)	77
Figure S3. Concentração no LCR dos aminoácidos Alanina e Triptofano 2 dias pós-FPI	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Transportadores de monocarboxilatos (MCTs), sua afinidade por substratos e localização no SNC de roedores	13
--	----

CAPÍTULO 2

Table S1: Detailed explanation of García's Neurologic Score attribution of points on animal's performance. Adapted from García et al., 1995	78
--	----

Table S2: Means and S.E.M. values for all experimental groups during a 6-week analysis in the cylinder test	79
--	----

Table S3: Means and S.E.M. values for all experimental groups during a 6-week analysis in the García's Neurologic Score	79
--	----

RESUMO

A isquemia cerebral (IC) é uma das principais causas de morte e morbidade no mundo. A ausência de agentes neuroprotetores eficazes na clínica estimulou a busca por mecanismos endógenos de neuroproteção e como ativá-los. Sabe-se que a penumbra, região no entorno do infarto, pode passar por alterações celulares e moleculares para adaptar-se à lesão isquêmica, sendo considerada um alvo terapêutico potencial. Um dos mecanismos patofisiológicos da IC envolve a liberação excessiva de glutamato, o principal aminoácido excitatório no sistema nervoso central de mamíferos, causando excitotoxicidade. Além de neurotransmissor, o glutamato é um intermediário metabólico, estando intimamente relacionado com mecanismos de suporte energético. Considerando a importância do glutamato para o metabolismo e a interconectividade cerebral, bem como sua contribuição para a propagação da lesão isquêmica, esta tese teve como objetivo avaliar as alterações cerebrais relacionadas à indução de isquemia focal permanente (FPI) na zona de penumbra, com enfoque no sistema glutamatérgico, no metabolismo energético, alterações astrocíticas e parâmetros comportamentais em ratos adultos. No primeiro capítulo, utilizamos um modelo experimental de FPI induzida cirurgicamente por termocoagulação do sangue no interior dos vasos piais nos córtices motor e sensorio-motor em ratos Wistar machos adultos. Observamos que a maioria das alterações neuroquímicas ocorreu no hemisfério lesionado e persistiu até 9 dias pós-FPI. A captação de glutamato, bem como a oxidação de lactato estavam aumentadas em ambos os hemisférios 2 dias pós-FPI, sugerindo que o glutamato poderia estar sendo convertido em lactato para suporte neuronal. Observamos um aumento da oxidação de substratos *ex vivo*, bem como uma compensação da diminuição do imunocontéudo de MCT2 pelo aumento de MCT4, indicando uma adaptação metabólica à lesão. Em um segundo estudo, foi utilizado um pré-tratamento com ceftriaxona (CTXpre, 200 mg/kg/dia, por 5 dias, i.p.), conhecido por aumentar a expressão/atividade de GLT-1, principal transportador glutamatérgico do cérebro adulto, para estudar seus efeitos no metabolismo energético frente à FPI. O CTXpre diminuiu o volume do infarto e melhorou o desempenho motor, preservando a memória de curto prazo. O CTXpre não preveniu a diminuição da proteína GLT-1 pós-FPI, mas potencializou a atividade de captação de glutamato por preservar a atividade da glutamina sintetase. O CTXpre preveniu completamente o aumento da oxidação de substratos causado pela FPI, exceto para o glutamato. O perfil de aminoácidos no líquido cefalorraquidiano sugere uma maior oxidação de glutamato no grupo isquêmico pré-tratado. Juntos, esses resultados destacam a importância do gerenciamento energético do glutamato como alvo terapêutico, evidenciando seu impacto no prognóstico a médio e longo prazos frente a um modelo experimental de FPI.

Palavras-chave: Isquemia Cerebral, oclusão permanente, metabolismo energético cerebral, glutamato, acoplamento astrócito-neurônio, ceftriaxona

ABSTRACT

Cerebral ischemia (IC) is a major cause of death and morbidity worldwide. The absence of effective neuroprotective agents in the clinic has stimulated the search for endogenous mechanisms of neuroprotection and how to activate them. It is known that the penumbra, the region surrounding the infarct, can undergo cellular and molecular changes to adapt to the ischemic injury, being considered a potential therapeutic target. One of the pathophysiological mechanisms of IC involves the excessive release of glutamate, the main excitatory amino acid in the central nervous system of mammals, causing excitotoxicity. In addition to its role as a neurotransmitter, glutamate is a metabolic intermediary closely related to energy support mechanisms. Considering the importance of glutamate for brain metabolism and interconnectivity, as well as its contribution to the propagation of ischemic damage, this thesis aimed to evaluate alterations related to the induction of focal permanent ischemia (FPI) in the penumbra zone, focusing on the glutamatergic system, energy metabolism, astrocytic parameters and behavioral aspects in rats. In the first chapter, we used an experimental model of FPI surgically induced by thermocoagulation of the blood inside the pial vessels in the motor and sensorimotor cortex in adult male Wistar rats. We observed that most neurochemical alterations occurred in the injured hemisphere and persisted until 9 days post-FPI. Glutamate uptake and lactate oxidation were increased simultaneously in both hemispheres 2 days post-FPI, suggesting that glutamate-derived lactate could be supporting neurons metabolically. We observed an increase in substrates oxidation *ex vivo*, as well as compensation for the decrease in MCT2 immunocontent by the increase in MCT4, indicating a metabolic adaptation to the lesion. In a second study, we used a pretreatment with ceftriaxone (CTXpre, 200 mg/kg/day, for 5 days, i.p.) known to increase the expression/activity of GLT-1, the main glutamatergic transporter of the adult brain, to study its effects on energy metabolism after FPI induction. CTXpre decreased cerebral infarction volume and improved motor performance, preserving short-term memory. CTXpre did not prevent the decrease in GLT-1 protein post-FPI, but potentiated glutamate uptake by preserving glutamine synthase activity. CTXpre completely prevented the increase in substrate oxidation caused by FPI, except for glutamate. The amino acid profile in the cerebrospinal fluid suggest greater oxidation of glutamate in the pretreated ischemic group. Together, these results highlight the importance of glutamate metabolic handling as a promising therapeutic target, as well as its impact on the medium and long-term prognosis in an experimental FPI model.

Key words: Cerebral ischemia, permanent occlusion, brain energy metabolism, glutamate, astrocyte-neuron coupling, ceftriaxone

APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por:

1. **Introdução:** embasamento teórico para a compreensão da proposta de trabalho e das hipóteses;
2. **Objetivos:** descrição dos objetivos geral e específicos a serem desenvolvidos ao longo dos capítulos;
3. **Abordagem Metodológica:** descrição geral do modelo experimental e dos métodos utilizados;
4. **Resultados**, constituídos pelos capítulos 1 e 2.
 - **Capítulo 1**, artigo publicado na revista *Molecular Neurobiology*: *Cortical Bilateral Adaptations in Rats Submitted to Focal Cerebral Ischemia: Emphasis on Glial Metabolism*;
 - **Capítulo 2**, artigo em preparação: Pharmacologic preconditioning shifts glutamate metabolic fate after focal permanent ischemia.
5. **Discussão:** interpretação dos resultados apresentados e sua contextualização;
6. **Conclusões e perspectivas;**
7. **Adendo:** aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais e relato de participação em outras publicações durante o período do doutorado;
8. **Referências bibliográficas.**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Isquemia Cerebral

A isquemia cerebral (IC) é uma das principais causas de morte e morbidade no mundo moderno (Demaerschalk, Hwang, and Leung 2010). Durante as últimas décadas, o acidente vascular encefálico (AVE), como é conhecido clinicamente, permaneceu sendo a segunda maior causa de morte ao redor do mundo (Mozaffarian et al. 2016). Entre 1990 e 2010, a incidência e a mortalidade têm diminuído nos países desenvolvidos; entretanto, nenhuma mudança significativa foi vista nos países em desenvolvimento, onde o número de mortes causadas por AVE aumentou ao longo do tempo (Krishnamurthi et al. 2013; Vos et al. 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde, o AVE é a principal causa de incapacidade adquirida no Brasil, sendo responsável por um número considerável de internações e tendo uma incidência anual de 108 para cada 100 mil habitantes (Botelho et al. 2016). Mesmo com o desenvolvimento de políticas de prevenção e controle dos fatores de risco envolvidos na IC (*i.e.* hipertensão, tabagismo, doenças cardiovasculares), o índice de mortalidade tende a decair mais rapidamente que a incidência, resultando em um fardo socioeconômico considerável (Koton et al. 2014; Carmichael 2015).

AVES são um grupo heterogêneo de doenças. Há mais de 2400 anos, Hipócrates descreveu pela primeira vez o início de uma paralisia repentina e violenta, criando o termo “*apoplexia*” para denominar qualquer tipo de morte súbita. Somente em meados do século XVII, Johann Jakob Wepfer, médico suíço, descreveu a primeira evidência de que a *apoplexia* era causada por uma hemorragia intracerebral (AVE hemorrágico) ou pela oclusão de uma artéria cerebral (AVE isquêmico) (Engelhardt 2017). Em ambos os casos, o suprimento insuficiente de oxigênio e glicose à demanda metabólica cerebral resulta em morte celular poucos minutos após o seu início (Dirnagl, Ladecola, and Moskowitz 1999; Broughton, Reutens, and Sobey 2009).

A oclusão de artérias cerebrais corresponde à 80-85% de todos os AVES no ocidente (American Stroke Association 2012). Os AVES do tipo isquêmico são causados por uma redução ou por um bloqueio do fluxo sanguíneo no território de uma artéria cerebral – podendo ser desencadeados por: (i) hipoperfusão, quando o fluxo sanguíneo cerebral é interrompido ou reduzido por parada cardíaca, afetando o cérebro por inteiro (IC global); e (ii) trombose ou embolismo, quando o fluxo sanguíneo é interrompido ou reduzido em uma região cerebral específica por um coágulo (IC

focal). Embolismos arterioarteriais ou até mesmo de origem cardíaca representam 75% dos casos de oclusão de vasos e são a causa mais frequente de bloqueio de fluxo sanguíneo focal no cérebro (Mergenthaler, Dirnagl, and Kunz 2013).

Há outras causas de infarto cerebral e sua distinção é essencial para o tratamento dos pacientes. Entretanto, sua incidência é menor e, portanto, não fazem parte do escopo desta tese.

1.1.1. Patofisiologia da Lesão Isquêmica

O bloqueio do fluxo sanguíneo desencadeia uma série de processos neuroquímicos, os quais são referidos em seu conjunto como cascata isquêmica (Brouns and De Deyn 2009). A propagação da injúria é um fenômeno heterogêneo que, uma vez iniciada, pode durar horas ou dias, mesmo após a restauração da circulação sanguínea (Zivin 1998).

Os mecanismos patofisiológicos da IC têm início com a redução ou bloqueio hemodinâmico, resultando na diminuição de oxigênio e glicose e no comprometimento da síntese de ATP através da glicólise e da fosforilação oxidativa. O funcionamento do transporte iônico dependente de energia, como a Na^+/K^+ ATPase, fica comprometido e a entrada de íons sódio nas células por gradiente de concentração resulta em: (i) despolarização neuronal e glial (Katsura, Kristian, and Siesjo 1994; Martin, Lloyd, and Cowan 1994); (ii) ativação de canais de cálcio voltagem-dependente; e (iii) liberação de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular, como o glutamato (Phillis et al. 1996). O acúmulo de glutamato na fenda sináptica ocorre não só pelo aumento de sua liberação do terminal pré-sináptico, mas também porque sua captação está desabilitada, uma vez que seu transporte é eletrogênico e dependente de energia. Além disso, as condições iônicas no núcleo do infarto podem favorecer a reversão do transporte de glutamato em astrócitos, exacerbando ainda mais sua concentração no meio extracelular (Malarkey and Parpura 2008). A estimulação contínua e excessiva de seus receptores ionotrópicos (*i.e.*, NMDAR, AMPAR e cainato) resulta na perda da homeostase do cálcio e na ativação de eventos intracelulares que culminam em morte celular (Mayor and Tymianski 2018). Esse fenômeno é conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica (Figura 1), um dos

primeiros eventos patofisiológicos da IC e um dos principais mediadores da morte celular.

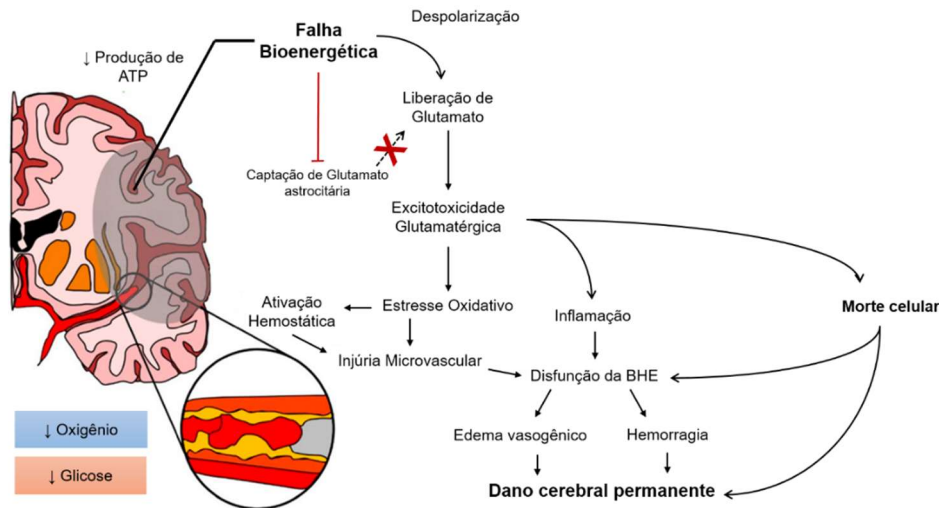


Figura 1. Representação diagramática dos principais mecanismos patofisiológicos que levam ao dano cerebral permanente na IC. O conjunto desses processos é denominado cascata isquêmica, uma vez que parecem ocorrer quase que sequencialmente após a interrupção do fluxo sanguíneo cerebral. ATP: adenosina trifosfato; BHE: barreira hematoencefálica. Adaptado de Bonaventura *et al.* (2016).

A limitação de reservas energéticas cerebrais e a dependência do metabolismo aeróbico da glicose contribuem enormemente para a vulnerabilidade do tecido cerebral à isquemia; entretanto, a conectividade intrínseca e os mecanismos de sinalização tornam-se prejudiciais nessas condições, auxiliando na propagação da lesão (Calabresi, Centonze, and Bernardi 2000).

1.1.2. Zona de Penumbra como alvo terapêutico

Destacam-se duas áreas pertinentes para a compreensão patofisiológica da IC: o núcleo da região cerebral com o fluxo sanguíneo comprometido, denominado *core* isquêmico (centro do infarto), e a região no entorno que apresenta uma perfusão intermediária, denominada penumbra. O centro do infarto consiste na região cerebral mais prejudicada pela hipoperfusão sanguínea, na qual neurônios sofrem morte celular em apenas alguns minutos do início da oclusão do vaso (Brouns and De Deyn 2009). Em contraste, a zona de penumbra é classificada como um tecido viável estruturalmente, uma vez que apresenta uma perfusão oriunda da circulação colateral capaz de preservar os canais iônicos, mantendo as células neurais quiescentes

(Minnerup et al. 2012). O termo “penumbra” faz referência à área ao redor de uma sombra projetada por um objeto opaco, como o da sombra da Terra ou da Lua sobre uma região durante um eclipse parcial, sendo apropriado para definir as características do tecido ao redor da lesão, bem como sua localização física no entorno do centro do infarto (Astrup, Siesjo, and Symon 1981).

O conceito de penumbra evoluiu para refletir aplicações mais práticas do seu potencial como alvo terapêutico. Considerando a dificuldade de definir a zona de penumbra por métodos de imagem, sua identificação pode ser baseada na cascata de eventos propagados do núcleo que culminam em alterações celulares e moleculares no tecido ao redor. Esses processos metabólicos deletérios propagados para a penumbra incluem excitotoxicidade, estresse oxidativo e resposta inflamatória, os quais levam à expansão do núcleo isquêmico e ao subsequente agravamento do desfecho clínico (Ramos-Cabrer et al. 2011). Entretanto, essas alterações ocorrem em um ritmo mais lento na penumbra do que no *core*, possibilitando o “resgate” de tecido viável com intervenções rápidas envolvendo reperfusão tecidual ou, ainda, a utilização de compostos neuroprotetores. Por seu potencial de recuperação, a zona de penumbra é o tema central de diversas pesquisas relacionadas à IC.

1.1.3. Modelos Experimentais de IC in vivo

Existem diversos modelos animais de AVE utilizados para o estudo dos mecanismos patofisiológicos da IC, bem como para o desenvolvimento de novos tratamentos. O emprego de ratos como modelos experimentais é a opção mais comum por apresentar algumas vantagens, incluindo baixo custo de obtenção, de manutenção, e grande aceitabilidade pela perspectiva ética (Fluri, Schuhmann, and Kleinschnitz 2015). Apesar das limitações relacionadas aos diferentes modelos, é possível destacar que os ratos apresentam uma vasculatura cerebral e uma fisiologia semelhantes aos seres humanos, sendo fácil monitorar seus parâmetros fisiológicos e apresentando uma homogeneidade relativa entre linhagens (Strom et al. 2013).

Um dos métodos mais empregados para a indução de IC envolve a oclusão da artéria cerebral média (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*), uma vez que essa artéria e suas ramificações representam aproximadamente 70% dos infartos cerebrais

causados pelo AVE isquêmico (Garcia 1984; Bogousslavsky, Van Melle, and Regli 1988; Hossmann 1991; Takizawa and Hakim 1991). A oclusão intra-arterial por sutura é o método mais utilizado, sendo o modelo de oclusão transitória (tMCAO) o mais empregado, correspondendo a 88% dos estudos em IC (Howells et al. 2010). Mesmo representando a localidade dos infartos em humanos mais fielmente, os resultados obtidos por tMCAO em roedores são altamente dependentes da área atingida, da duração da oclusão, do local de indução e do fluxo sanguíneo colateral. Também há uma incidência considerável de hemorragia subaracnóide e a possibilidade de a oclusão ser inadequada, dependendo do tipo de sutura empregada (Fluri, Schuhmann, and Kleinschnitz 2015). Resultados discrepantes podem contribuir para o fracasso dos agentes neuroprotetores em ensaios clínicos, refletindo o baixo potencial translacional desse modelo. Alguns pesquisadores ainda questionam se a utilização majoritária de tMCAO na pesquisa básica pode ser o reflexo da alta taxa de efeitos positivos na testagem de novos fármacos, possibilitando a publicação de trabalhos de alto impacto, mas com uma pobre contribuição para o manejo clínico da doença (Sommer 2017; Hossmann 2012).

Outros modelos bastante empregados incluem a realização de craniotomia, permitindo acesso às artérias cerebrais e, principalmente, às ramificações distais da artéria cerebral média. Para esta tese, o modelo escolhido foi o de IC focal permanente (FPI, *focal permanent ischemia*) induzida por termocoagulação (Szele, Alexander, and Chesselet 1995), considerando que, em humanos, a incidência maior é de oclusões permanentes (Yu et al. 2015). A técnica para a realização de FPI é de fácil desenvolvimento, apresenta uma menor variabilidade e um menor tamanho de lesão, possibilitando um melhor acompanhamento das regiões afetadas pela FPI posteriormente à indução, em um tamanho de área significativo para as análises visadas. Ainda, a indução de IC por termocoagulação nos permite utilizar um número menor de animais e realizar análises mais precisas no metabolismo energético cerebral e eventuais compostos neuroprotetores (Hansel et al. 2014).

1.2. Sistema Glutamatérgico

O glutamato é o principal aminoácido excitatório no SNC de mamíferos, em parte devido à sua natureza onipresente e por seus papéis diversos no metabolismo. A neurotransmissão glutamatérgica é essencial para diversos processos neurofisiológicos, como transmissão sináptica, aprendizado e memória, maturação neuronal e sinaptogênese. Entretanto, níveis excessivos desse neurotransmissor na fenda sináptica resultam em dano excitotóxico, um fenômeno que ocorre em diversas desordens e que está envolvido na patofisiologia da IC (Brouns and De Deyn 2009).

Em condições fisiológicas, o glutamato é ativamente removido da fenda sináptica por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT, *excitatory amino acid transporter*) que estão presentes tanto em células gliais como nos neurônios (Danbolt 2001). Cinco isoformas desses transportadores foram identificadas: EAAT1, análogo ao GLAST (*Glutamate-aspartate transporter*, transportador de glutamato e aspartato); EAAT2, análogo ao GLT-1 (*Glutamate transporter 1*, transportador de glutamato 1); EAAT3, análogo ao EAAC1 (*Excitatory amino acid carrier*, carreador de aminoácido excitatório 1); EAAT4, encontrado principalmente em neurônios; e EAAT5 (Had-Aissouni 2012). Os transportadores que mais contribuem para a captação do glutamato são o EAAT1/GLAST e o EAAT2/GLT-1, ambos localizados em processos astrocitários associados à sinapse.

Os transportadores astrocitários GLAST e GLT-1 removem o glutamato do meio extracelular por meio do co-transporte de três íons Na^+ e um íon H^+ , somado à extrusão de um íon K^+ . Por depender de gradiente eletrogênico, o transporte de glutamato é dependente do funcionamento da Na^+/K^+ ATPase, tornando a captação desse neurotransmissor um processo custoso energeticamente (Danbolt 2001). Nas condições patofisiológicas da IC, o comprometimento da síntese de ATP inviabiliza a manutenção do gradiente eletroquímico da membrana celular, ocasionando tanto a liberação excessiva de glutamato do terminal pré-sináptico quanto a inibição de sua captação (ou mesmo a reversão do transporte) pelo astrócito, contribuindo para a progressão do dano isquêmico (Phillis, Ren, and O'Regan 2000; Bonde et al. 2003).

1.2.1. Excitotoxicidade e Neuroproteção

O conceito de neuroproteção originou-se principalmente de estudos relacionados à patofisiologia dos AVEs isquêmicos, no qual o objetivo principal era contrabalancear as cascatas de eventos nocivos à sobrevivência neuronal, evitando a sua propagação. Nas últimas décadas, a neurotoxicidade mediada pelo glutamato tem sido um dos maiores focos das pesquisas em IC (Wu and Tymianski 2018), uma vez que esse neurotransmissor tem um papel central na propagação do dano isquêmico (Lai, Zhang, and Wang 2014). Por ser um dos primeiros e mais intensos eventos da cascata isquêmica, a busca por antagonistas da excitabilidade neuronal mediada pelo glutamato se intensificou, uma vez que se pensava que essas moléculas também seriam capazes de prevenir a neurotoxicidade associada, e, por consequência, seriam “neuroprotetoras”. Apesar de inúmeros agentes terem sido desenvolvidos e testados em modelos animais, sua tradução para a clínica não teve sucesso (Cheng, Al-Khoury, and Zivin 2004).

A falha dos ensaios clínicos com agentes neuroprotetores pode ser atribuída a diversos fatores, dentre eles a alta complexidade dos processos da cascata isquêmica (Xu and Pan 2013). Por décadas, pesquisadores tentaram identificar um alvo primordial para prevenir a morte neural e, infelizmente, essa estratégia não foi bem-sucedida. Isso sugere que a cascata isquêmica não ocorre de forma serial, mas que é composta de diversos processos que acontecem simultaneamente. Também foram observadas falhas no recrutamento de pacientes para os ensaios clínicos, o que explicaria a dificuldade de converter os achados experimentais em tratamentos efetivos (Dirnagl and Macleod 2009; Howells, Sena, and Macleod 2014).

Em resumo, a pesquisa biomédica deve ir além da compreensão patofisiológica da IC e buscar o entendimento dos processos adaptativos cerebrais que poderiam prevenir a propagação do dano isquêmico. Assim, a identificação de vias intrínsecas de sobrevivência celular pode providenciar novas oportunidades de um tratamento neuroprotetor efetivo.

1.2.2. Glutamato como intermediário metabólico

Embora se saiba que o glutamato tem efeitos no SNC há mais de 75 anos, somente em 1984 ele foi verdadeiramente reconhecido como molécula

neurotransmissora (Fonnum 1984). Originalmente, acreditava-se que o glutamato era apenas um intermediário metabólico no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), pois esse aminoácido foi encontrado em vários compartimentos intracelulares, incluindo o citosol e as mitocôndrias de todos os tipos celulares do SNC (Krebs 1935).

Assim como os demais aminoácidos, o glutamato tem um grupo carboxila e um grupo amino terminais. O C-terminal e o esqueleto de carbono derivam da glicose, uma vez que o glutamato não cruza a BHE e deve ser sintetizado no SNC. A glicose é degradada através da via glicolítica e convertida em piruvato. Este entra no ciclo do TCA, gerando α -cetoglutarato, que pode ser transaminado e receber um grupo amino de um aminoácido de cadeia ramificada, gerando o glutamato. Somando-se ao seu papel como neurotransmissor, o glutamato também serve como intermediário metabólico (Figura 2), sendo necessário para a síntese de GABA e de derivados de aminoácidos, como o antioxidante glutathiona reduzida (GSH). Consistente com seu papel principal em múltiplos aspectos da fisiologia cerebral, estudos metabólicos determinaram que virtualmente toda a glicose que adentra o SNC é eventualmente convertida em glutamato (Shen et al. 1999; Hertz and Chen 2017).

Após sua liberação do terminal pré-sináptico, o glutamato é captado pelos transportadores astrocitários e, no citosol, é convertido em glutamina pela atividade da glutamina sintetase (GS). A glutamina produzida nos astrócitos é exportada para os neurônios, onde, por reação da glutaminase, é reconvertida em glutamato para armazenamento vesicular (Figura 2). Esse processo cíclico é denominado de “ciclo glutamato-glutamina” e demonstra que há um acoplamento metabólico entre astrócitos e neurônios.

Alternativamente, o glutamato pode ser (re)convertido a α -cetoglutarato e entrar no ciclo do TCA, rendendo o equivalente a 9 moléculas de ATP. Estudos sugerem que o próprio glutamato pode regular seu destino metabólico tanto para o catabolismo quanto para o anabolismo: quando as concentrações extracelulares de glutamato aumentam significativamente, a proporção de glutamato oxidado pelo ciclo do TCA nos astrócitos também aumenta, bem como sua conversão em glutamina diminui (McKenna et al. 1996). A utilização de glutamato para produção de energia parece tão importante para manter a homeostase sináptica/metabólica que nenhum outro

substrato energético pode efetivamente diminuir sua oxidação por competitividade em astrócitos de córtex de ratos (McKenna 2012; Souza et al. 2019).

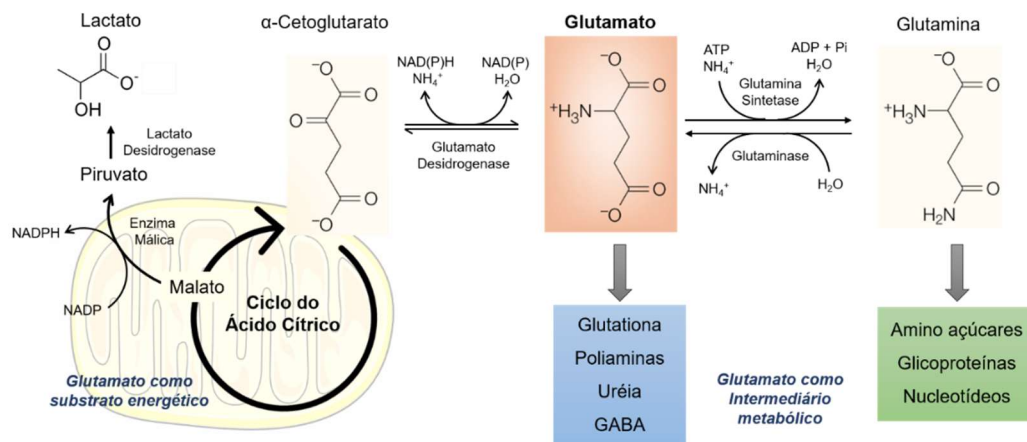


Figura 2. Glutamato e suas funções para além da neurotransmissão. Os aminoácidos glutamato e glutamina são essenciais para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos devido ao seu grupamento amino. A transaminação do α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo do TCA, produz glutamato, enquanto que a glutamina é sintetizada pela incorporação de um íon amônio na molécula de glutamato. As duas enzimas responsáveis por catalisar essas duas reações – glutamato desidrogenase e glutamina sintetase – estão presentes em quase todos os organismos vivos. O glutamato ainda pode entrar no ciclo do TCA como α -cetoglutarato e ter seus carbonos convertidos em lactato, o qual é exportado para uso neuronal. GABA, ácido γ -aminobutírico. Adaptado de Nedergaard *et al.* (2002).

Considerando a onipresença e a importância do glutamato para metabolismo e a interconectividade cerebral, bem como sua contribuição para a propagação da lesão isquêmica, parece provável que esse aminoácido participe de alterações metabólicas decorrentes da IC. Um entendimento mais completo das funções do glutamato em doenças neurodegenerativas pode auxiliar na descoberta de novos alvos terapêuticos relacionados à excitotoxicidade e aumentar seu potencial translacional.

1.3. Metabolismo Energético Cerebral

As funções cognitivas mais evoluídas do cérebro humano exigem um alto investimento metabólico. Apesar de representar apenas 2% do peso corporal total, esse órgão é responsável pelo consumo de 20% da energia do organismo em condições de repouso (Magistretti 1999; Belanger, Allaman, and Magistretti 2011; Cunnane et al. 2011). A manutenção e a restauração do gradiente iônico dissipado pelos potenciais de ação são os principais processos que contribuem para a elevada demanda energética do tecido cerebral (Alle, Roth, and Geiger 2009; Prins 2008).

Além disso, a limitação de reservas energéticas o torna altamente dependente do fluxo sanguíneo e do metabolismo aeróbico da glicose para a síntese de ATP. Como consequência, o cérebro é extremamente vulnerável ao dano isquêmico em comparação com outros tecidos (Dugan and Choi 1999).

Nos últimos anos, tornou-se evidente que alterações metabólicas influenciam fortemente o início e a progressão de diversas doenças neurodegenerativas. Portanto, o entendimento da diferenciação e da especialização do metabolismo energético cerebral é um pré-requisito essencial para a compreensão de sua fisiologia e patofisiologia (Camandola and Mattson 2017).

1.3.1. A glicose está no centro do metabolismo cerebral

O cérebro adulto, em condições fisiológicas, utiliza praticamente só glicose como substrato energético. Como em outros tecidos, o metabolismo da glicose pode seguir diferentes rotas metabólicas; entretanto, no cérebro, ela é oxidada a CO₂ e água quase que em sua totalidade, produzindo aproximadamente 32 moléculas de ATP no processo (Mergenthaler et al. 2013). Além disso, seu metabolismo está intimamente relacionado à biossíntese de diversas moléculas, bem como é essencial para a produção dos três principais neurotransmissores cerebrais: glutamato, GABA e acetilcolina (Gibson, Peterson, and Sansone 1981). O processamento da glicose através da via glicolítica também é essencial para a produção de glicogênio astrocitário e para a síntese de nucleotídeos e NADPH pela via das Pentoses Fosfato (Figura 3).

Por sua importância no metabolismo energético cerebral, diversos estudos buscaram a identificação de outras moléculas que pudessem substituir a glicose como uma fonte alternativa para a produção de ATP. Os corpos cetônicos, por exemplo, são consumidos preferencialmente durante o desenvolvimento do SNC e em condições como jejum prolongado em adultos (Camandola and Mattson 2017), enquanto que a utilização de lactato ocorre durante a prática de atividade física e até mesmo durante ativação neuronal (Belanger, Allaman, and Magistretti 2011). Essa capacidade aponta para a existência de mecanismos adaptativos que são regulados no cérebro de acordo

com a situação metabólica ou segundo a demanda energética, garantindo uma flexibilidade mínima para a manutenção da homeostase celular.

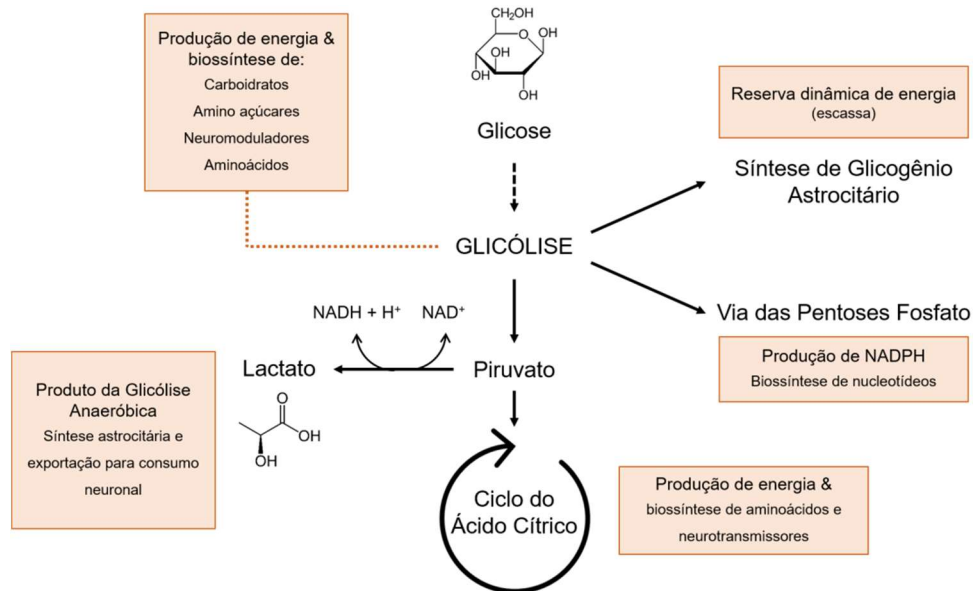


Figura 3. Papel central da glicose no metabolismo cerebral. O eixo central representa a maior porcentagem de consumo de glicose sob a forma de substrato energético. O que torna a D-glicose um substrato obrigatório para o tecido cerebral é sua capacidade de distribuir seus carbonos dentre os intermediários do ciclo do TCA, além de contribuir para a biossíntese de moléculas essenciais (e.g. glutamato e GABA). Adaptado de Deitmer et al. 2019.

1.3.2. O lactato como substrato alternativo

Por muito tempo, o lactato foi considerado somente um metabólito residual sem nenhuma função no metabolismo. Ele pode ser produzido intracelularmente pela glicólise anaeróbica, auxiliando na regeneração do NAD⁺ (Figura 3), e pode ser obtido da circulação periférica. O aumento da concentração sanguínea de lactato, como ocorre durante o exercício físico, aumenta linearmente a sua contribuição para o metabolismo energético cerebral, sugerindo que ele pode ser prontamente utilizado para produção de ATP (Magistretti I. and Pfaff 2013). Estudos já demonstraram sua capacidade de sustentar a função neuronal durante atividade sináptica e na ausência de glicose, indicando que o lactato poderia ter uma função para além de seu papel como subproduto da via glicolítica (McIlwain 1956; Bergersen 2015), inclusive potencial neuroprotetor em condições metabólicas semelhantes às da IC (Patet et al. 2015; Berthet et al. 2012).

O lactato é um ácido monocarboxílico, assim como o piruvato e os corpos cetônicos. Por serem substâncias hidrofílicas, os ácidos monocarboxílicos não difundem através da membrana plasmática e devem ser carregados por transportadores específicos para atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) e as membranas de cada tipo celular. A família dos transportadores de monocarboxilatos (MCT) é composta de 14 membros, dentre os quais somente os 4 primeiros, MCT1 a 4 (Tabela 1), mostraram atuar por meio de um sistema de co-transporte de monocarboxilatos e prótons por um mecanismo de simporte. Esses transportadores são distintos um do outro não somente por sua cinética, mas também pela sua distribuição tecidual e localização celular (Pierre and Pellerin 2005). Após serem carregados para o citosol, os monocarboxilatos são metabolizados na mitocôndria, produzindo ATP por meio do ciclo do TCA e da fosforilação oxidativa (Souza et al. 2019).

Tabela 1. Transportadores de Monocarboxilatos (MCTs), sua localização no SNC de roedores, bem como uma breve descrição de sua afinidade pelos substratos. Adaptado de Felmler et al. 2020.

Transportador	Localização no SNC	Afinidade	Referência(s)
MCT1	Mais abundantemente presente nas células endoteliais formadoras de vasos, mas também está presente em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia.	Alta afinidade por piruvato, também transporta lactato e corpos cetônicos	Baud et al. 2003
MCT2	Mais específico de células neuronais, especialmente em córtex, hipocampo e cerebelo. Associado com o transporte de monocarboxilatos em projeções axonais e também no terminal pós-sináptico.	Alta afinidade por todos os substratos, menor Km	Pierre, Magistretti, and Pellerin 2002
MCT3	Expresso exclusivamente no epitélio pigmentado retinal.	Ainda não caracterizada	Philp, Yoon, and Lombardi 2001 Halestrap and Wilson 2012
MCT4	Expresso exclusivamente em astrócitos em diversas regiões cerebrais.	Baixa afinidade para a maioria dos substratos	Dimmer et al. 2000 Pierre and Pellerin 2005

Ao longo dos anos, diversos estudos confirmaram que o lactato é eficientemente oxidado no cérebro, particularmente pelas células neuronais, sugerindo inclusive que poderia haver uma preferência por oxidar lactato em detrimento de glicose (Bouzier-Sore et al. 2003; Zielke, Zielke, and Baab 2009). Tal hipótese sustenta a teoria de

compartimentalização metabólica entre os diferentes tipos celulares do SNC e sugere a existência de uma interdependência metabólica entre eles.

1.3.3. Acoplamento Neurometabólico

O metabolismo energético cerebral também é caracterizado por ter uma divisão marcante de funções metabólicas entre os tipos celulares. Entretanto, esses processos, por mais que sejam compartimentalizados, não deixam de ser interdependentes.

Como já mencionado anteriormente, as células neurais conseguem eficientemente utilizar fontes energéticas alternativas, como o lactato, o piruvato, os corpos cetônicos, e até mesmo glutamato (Zielke, Zielke, and Baab 2009). A maioria desses substratos é derivada da glicose e, devido à compartimentalização dos processos metabólicos no cérebro, ocorre um relacionamento complexo entre células neuronais e gliais para a produção, transporte e consumo desses substratos. Tal processo é denominado acoplamento neurometabólico e está intimamente relacionado com a hiperemia funcional presente no metabolismo energético cerebral (Carmignoto and Gomez-Gonzalo 2010; Belanger, Allaman, and Magistretti 2011).

Por apresentar um alto requerimento de energia, os neurônios sustentam seu metabolismo com uma taxa oxidativa maior em comparação com as células gliais (Lebon et al. 2002; Bouzier-Sore et al. 2006; Boumezbeur et al. 2010). Para que isso aconteça, seu perfil metabólico é adaptado para exibir uma menor expressão protéica da enzima frutose-2,6-bisfosfatase-3, evitando a ativação da via glicolítica. Com isso, há uma maior metabolização da glicose pela via das pentoses fosfato, gerando NADPH e prevenindo estresse oxidativo neuronal (Souza et al. 2019). Conseqüentemente, o lactato é extremamente conveniente para a demanda energética neuronal, uma vez que este substrato pode ser eficientemente oxidado, produzindo ATP, ao mesmo tempo em que poupa glicose para a via das pentoses fosfato.

Mesmo apresentando uma menor taxa oxidativa em comparação com os neurônios, os astrócitos captam glicose avidamente e têm a glicólise plenamente

ativada. Uma boa parte da glicose degradada anaerobicamente é liberada no meio extracelular sob a forma de lactato (Souza et al. 2019). Assim, o fenótipo metabólico astrocitário é caracterizado por: (i) uma expressão substancial da enzima frutose-2,6-bisfosfatase-3, estimulando a glicólise por ativação alostérica; (ii) uma baixa expressão do carreador de Aspartato/Glutamato (CAG), garantindo a síntese lactato e uma alta razão NAD^+/NADH para sustentar a alta taxa glicolítica; e (iii) a expressão de MCT4, garantindo assim a exportação do lactato produzido para o meio extracelular, o qual será captado e consumido pelos neurônios.

Por apresentarem perfis metabólicos complementares, evidências experimentais conduziram à hipótese da existência de uma lançadeira de lactato astrócito-neurônio (ANLS, *astrocyte-neuron lactate shuttle*) *in vivo*, pela qual os astrócitos forneceriam aos neurônios um substrato energético complementar durante um período de grande atividade. Essa hipótese estabelece que a ativação neuronal regula um mecanismo que permite às células administrarem a demanda energética com os seguintes processos: (i) a ativação neuronal libera glutamato na fenda sináptica, o qual é captado pelos astrócitos por meio dos transportadores GLAST e GLT-1; (ii) o aumento intracelular na concentração de sódio ativa a Na^+/K^+ ATPase, aumentando temporariamente o consumo de ATP e estimulando a captação de glicose e a via glicolítica nos astrócitos; (iii) a glicólise aumenta a produção de lactato, o qual é liberado no espaço extracelular, onde é captado pelos neurônios via MCT e oxidado na mitocôndria (Pellerin and Magistretti 1994)(Figura 4).

Além de suporte energético, o acoplamento metabólico entre astrócitos e neurônios auxilia na manutenção dos níveis de glutamato por meio do ciclo glutamato-glutamina (Belanger, Allaman, and Magistretti 2011). Astrócitos são responsáveis pela transaminação do glutamato em glutamina pela ação enzimática da GS. A glutamina, por sua vez, é um aminoácido não-excitatório que pode ser exportado para o neurônio, onde será reconvertido em glutamato por meio da ação da glutaminase e empacotado em vesículas para liberação sináptica (Figura 4).

A relação astrócito-neurônio pode estar alterada após IC focal, considerando a baixa disponibilidade de substratos energéticos, o restrito fluxo sanguíneo na região afetada e a elevada demanda energética para responder às modificações patofisiológicas impostas pela propagação da lesão isquêmica. A investigação de como o metabolismo dessas células pode estar sofrendo modulações é de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

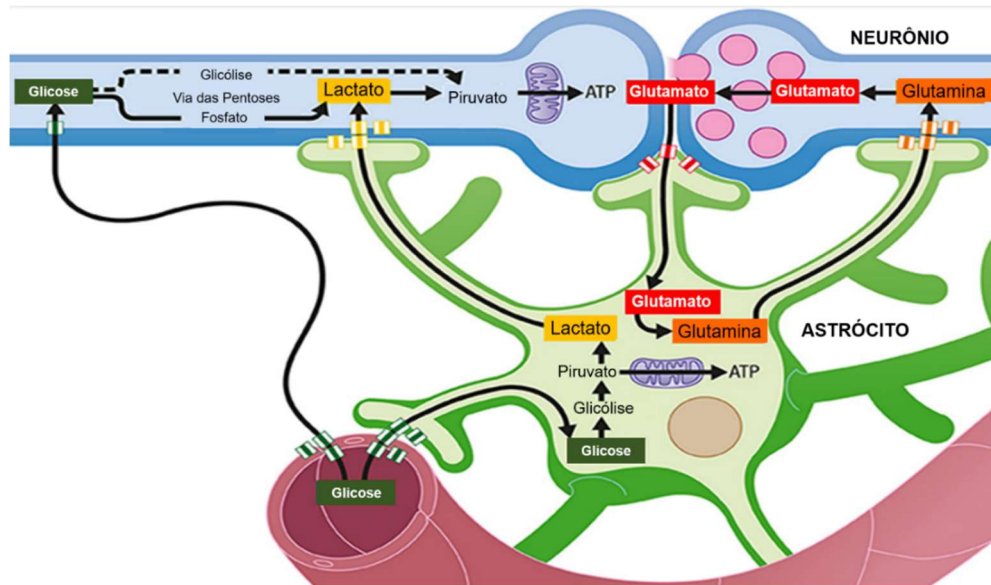


Figura 4. Acoplamento metabólico entre astrócitos e neurônios com destaque para a lançadeira de lactato (ANLS) e o ciclo glutamato-glutamina. Pela figura, podemos observar que o astrócito é representado com uma maior taxa glicolítica (produzindo lactato), enquanto que o neurônio é representado com uma maior taxa oxidativa (consumindo lactato via ciclo do TCA e fosforilação oxidativa). Também é possível observar que a localização espacial do astrócito permite uma interação bidirecional tanto com os neurônios quanto com a vasculatura. Adaptado de Demetrius, Magistretti, and Pellerin 2015.

1.4. Astroglia e Reatividade Astrocitária

Enquanto os neurônios são considerados a unidade básica do SNC, os astrócitos são conhecidos por diversas funções de suporte, tanto estrutural quanto metabólico (Sofroniew and Vinters 2010). A astroglia apresenta um posicionamento estratégico no tecido cerebral: seus processos interagem tanto com os vasos sanguíneos quanto com as células neuronais, formando unidades neurovasculares (Carmignoto and Gomez-Gonzalo 2010)(Figura 4). Além das funções de suporte neuronal já mencionadas anteriormente, essa localização privilegiada permite aos astrócitos o controle da captação e do fornecimento de substratos energéticos de acordo com a atividade neuronal local, ao mesmo tempo que regula o fluxo sanguíneo por meio da

liberação de moléculas vasoativas (Gordon, Mulligan, and MacVicar 2007; Koehler, Roman, and Harder 2009). Dessa forma, os astrócitos estão intimamente relacionados com a hiperemia funcional característica do metabolismo energético cerebral. Outras funções astrocitárias consideradas essenciais para a homeostase do SNC se encontram resumidas na Figura 5.

O estudo das funções das células gliais em doenças neurodegenerativas tornou-se essencial quando várias pesquisas que visavam ampliar o conhecimento dos mecanismos de dano neurônio-específico demonstraram que o funcionamento cerebral era muito mais complexo do que se pensava inicialmente. Dados da literatura vêm demonstrando que os astrócitos desempenham funções centrais nos mecanismos patofisiológicas ou de reparo (*i.e.*, neuroproteção) em várias desordens do SNC, podendo influenciar no seu percurso e, conseqüentemente, no seu prognóstico (K. Li et al. 2019; Sofroniew and Vinters 2010; Panickar and Norenberg 2005). Na IC, apesar dos astrócitos serem mais resilientes do que os neurônios, a lesão isquêmica pode prejudicar a função astrocitária e, conseqüentemente, impactar no suporte aos neurônios e causar morte celular (Nedergaard and Dirnagl 2005). Por serem abundantes e essenciais para a homeostase cerebral, acredita-se que os astrócitos sejam importantes alvos terapêuticos (Zhao and Rempe 2010).

Alterações astrocitárias estão entre as primeiras e mais impactantes respostas cerebrais à IC, exercendo também grande influência sobre o prognóstico (Petito and Babiak 1982; Pekny et al. 2019). Estímulos nocivos, como a IC, bem como outros elementos do SNC podem ativar os astrócitos, tornando-os reativos. A reatividade astrocitária pode ser definida como uma resposta à uma situação anormal no cérebro, a qual resulta na alteração morfológica, bioquímica, transcripcional e funcional na astroglia regional. Essa definição genérica se faz necessária por ainda não haver um consenso entre pesquisadores da área, visto a heterogeneidade estímulo-dependente das alterações astrocitárias (Escartin, Guillemaud, and Carrillo-de Sauvage 2019). Entretanto, diversos pesquisadores consideram a superexpressão e proteína glial fibrilar ácida (GFAP), uma proteína de citoesqueleto, um marcador potencial para reatividade astrocitária.

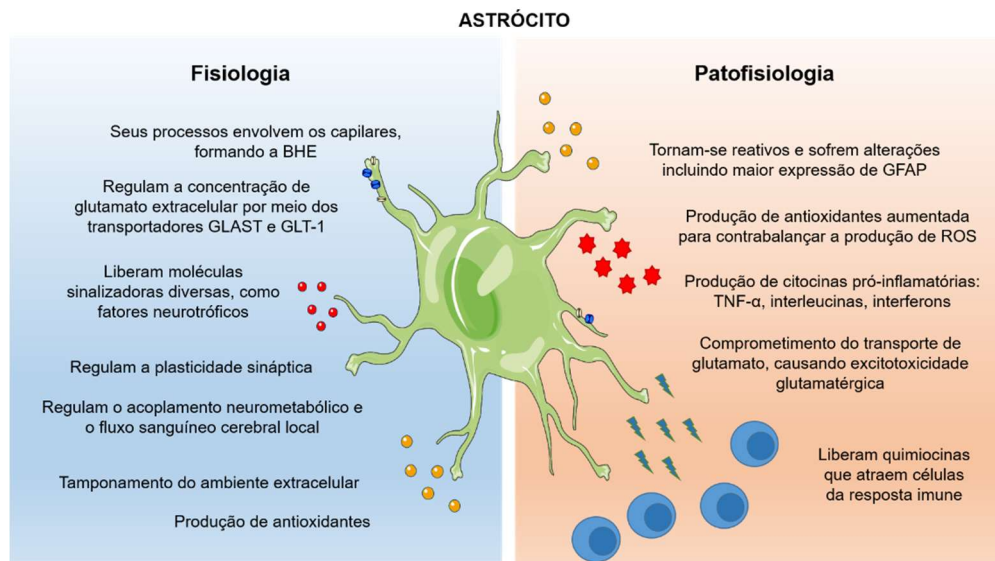


Figura 5. Esquema resumindo as funções desempenhadas pelos astrócitos na homeostase do SNC e na patofisiologia da IC. Nas doenças neurodegenerativas, os astrócitos se tornam responsivos e alteram dramaticamente seus fenótipos de maneira estímulo-dependente. BHE: barreira hematoencefálica; GFAP: proteína fibrilar ácida glial; GLAST: transportador de glutamato-aspartato; GLT-1: transportador de glutamato 1; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa. Adaptado de Siracusa, Fusco, and Cuzzocrea 2019.

Evidências iniciais sugeriram que a reatividade astrocitária é prejudicial à recuperação do tecido cerebral atingido, uma vez que ocorre a liberação de diversas substâncias (e.g. fatores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF β) que atuam de forma contrária à recuperação tecidual (Becerra-Calixto and Cardona-Gómez 2017)(Figura 5). Porém diversos estudos evidenciam um papel benéfico dos astrócitos e da reatividade astrocitária, incluindo (i) proteção do tecido viável contra danos excitotóxicos e estresse oxidativo (Nedergaard and Dirnagl 2005; Kaur and Ling 2008); (ii) reconstrução da BHE (del Zoppo 2009); (iii) produção de fatores neurotróficos que dão suporte à sobrevivência neuronal e glial (Buffo; Rolando; Ceruti, 2010; Heneka; Rodriguez; Verkhratsky, 2010); e (iv) liberação de moléculas antioxidantes (e.g., glutationa e superóxido dismutase). Além disso, evidências recentes apontam o envolvimento dos astrócitos na angiogênese, na plasticidade neuronal e na recuperação funcional pós-AVE (Jiang et al. 2013; Zhao and Rempe 2010; Hayakawa et al. 2010). É importante ressaltar que animais nocaute para GFAP exibem um maior tamanho de lesão do que os animais *wild type* em um modelo de IC focal (Nawashiro et al. 2000), enquanto que animais nocaute para

ambas GFAP e Vimentina (também proteína de citoesqueleto) mostraram ativação astrocitária prejudicada e diminuição em sua capacidade de captar glutamato pós-IC, sugerindo fortemente que a reatividade astrocitária pode apresentar efeitos benéficos para a recuperação cerebral pós-IC (Li et al. 2008).

Apesar do papel astrocitário estar relativamente esclarecido na fisiologia do metabolismo cerebral, seu papel no cenário pós-IC ainda precisa ser investigado (Dienel and Hertz 2005). Com o objetivo de conseguir um novo tratamento para o AVE isquêmico, pesquisadores têm estudado diversas abordagens para estimular as funções neuroprotetoras dos astrócitos. Alguns trabalhos sugerem uma abordagem preventiva, tais como o pré-condicionamento (Dirnagl, Becker, and Meisel 2009).

1.5. Pré-Condicionamento à IC

A pressão evolutiva sobre os organismos resultou no desenvolvimento de mecanismos endógenos protetores e compensatórios em caso de dano tecidual. Por consistir em uma privação de nutrientes e oxigênio, a IC representa um dos desafios mais elementares da natureza (Dirnagl, Becker, and Meisel 2009). Uma variedade de estímulos é capaz de promover a ativação de mecanismos de resiliência celular, e para fazer uso desses mecanismos terapeuticamente, foram desenvolvidas estratégias conhecidas como Pré-Condicionamento (PC) (Wang et al. 2015).

McDunn e Cobb citaram Nietzsche com a frase “aquilo que não nos mata, nos torna mais fortes” para contextualizar a natureza dos estímulos de PC e o paradoxo fisiológico que eles representam (McDunn and Cobb 2005). Em resumo, o PC é um procedimento pelo qual um estímulo nocivo abaixo do limiar de dano é aplicado a um tecido, desencadeando uma resposta adaptativa que culmina em um fenótipo celular transitório mais tolerante ao dano isquêmico. Experimentalmente, essa abordagem pode ser usada para identificar mecanismos endógenos de proteção e regeneração celular que, quando otimizados, poderiam ser traduzidos para a prática clínica (Dirnagl, Becker, and Meisel 2009).

A tolerância à IC (IT) pode ser amplamente dividida em dois tipos com base no tempo de início (e de duração): tolerância precoce ou rápida e tolerância tardia (Figura

6). No tipo rápido, os efeitos protetores na IT de curta duração são rápido aparecimento, podendo ser observados imediatamente após a aplicação do estímulo pré-condicionante. Já a IT tardia leva mais tempo para se tornar aparente (horas a dias), mas é sustentada por mais tempo (Bhuiyan and Kim 2010). Embora a maioria dos estímulos possa induzir ambos os tipos de IT, a tolerância rápida é induzida principalmente por modificações pós-traducionais (como fosforilação e alterações nas permeabilidades dos canais iônicos), enquanto que a tardia é mediada pela ativação gênica e síntese de novas proteínas. A IT rápida é atraente clinicamente em cirurgias de alto risco, como a cardíaca ou a cerebral (Dirnagl, Becker, and Meisel 2009). Por outro lado, a IT tardia aparenta ser mais robusta e duradoura, apresentando um efeito neuroprotetor mais forte e, portanto, atraente para o campo da neurociência.

Considerando seu papel na fisiologia e na fisiopatologia do cérebro, pode-se presumir que a astrogliia também participa da indução de tolerância à isquemia. Várias moléculas que desempenham papéis importantes no PC, e.g. adenosina, receptor de adenosina A1, fator induzido por hipóxia (HIF) e transportadores de aminoácidos excitatórios, são expressas em astrócitos (Dirnagl, Becker, and Meisel 2009).

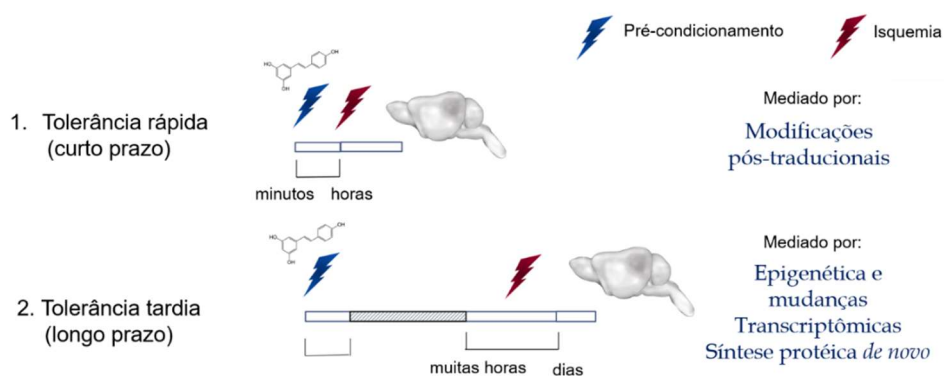


Figura 6. Janelas transientes em que a tolerância à IC é manifestada pelo tecido cerebral. **(1)** Tolerância rápida: se desenvolve poucos minutos após a exposição e dura apenas algumas horas. O efeito neuroprotetor é atribuído às modificações pós-traducionais transitórias; **(2)** Tolerância tardia: se desenvolve alguns dias após a exposição ao estímulo condicionante, mas diminui ao longo de uma semana. A tolerância observada na janela de longo prazo é atribuída a modificações epigenéticas e transcriptômicas, bem como à síntese proteica *de novo*. Repare que, entre a janela de curto e de longo prazo, há um período (indeterminado) em que a tolerância à IC não está funcional (área cinza). Adaptado de Khoury, Koronowski, and Perez-Pinzon 2016.

1.5.1. Indução da Tolerância à IC - Métodos de PC in vivo

Existem diferentes métodos para induzir tolerância à IC, sendo os estímulos prototípicos uma breve isquemia ou hipóxia cerebral (Sharp et al. 2004). Também existem outros tipos de estímulos endógenos e exógenos que comumente reiteram partes da isquemia, incluindo despolarização neuronal, hiperóxia, estresse oxidativo e hipoperfusão prolongada (Gidday 2006). No entanto, outras condições não relacionadas à isquemia, *i.e.* hipertermia, hipotermia ou tratamentos farmacológicos, também podem produzir tolerância (Stetler et al. 2014). Essa última forma de PC caracteriza um fenômeno conhecido como “tolerância cruzada” (*cross tolerance*), uma vez que um estressor pode sobrepor efeitos de outro estímulo.

O fato de existirem agentes químicos/farmacológicos que induzam tolerância à IC, como citocinas inflamatórias, anestésicos e inibidores metabólicos, aumenta a esperança de que, no futuro, seja possível ativar farmacologicamente as vias que levam ao fenótipo neuroprotetor e, portanto, apresentam uma grande chance de translação para a clínica (Hirayama and Koizumi 2018). Alguns estudos já reportaram o potencial neuroprotetor de alguns compostos que foram aplicados previamente à indução da lesão isquêmica.

Dentre as estratégias farmacológicas para induzir IT, a Ceftriaxona (CTX), um antibiótico β -lactâmico, é conhecida por exercer uma modulação potente sobre o transportador GLT-1, induzindo um aumento em sua expressão (Rothstein et al. 2005). A administração intraperitoneal de CTX por 5 dias consecutivos previamente à MCAO em ratos demonstrou reduzir significativamente o volume de infarto e déficits neurológicos (Krzyzanowska et al., 2016; Chu et al., 2007). Além de aumentar sua expressão gênica, foi demonstrado que a CTX é capaz de aumentar também a atividade funcional e bioquímica do GLT-1 *in vivo* (Hu et al. 2015), bem como apresentou ter efeitos neuroprotetores *in vitro* em modelos de isquemia e outros modelos experimentais de doenças neurodegenerativas (Rothstein et al. 2005; 1993). Por exibir resultados similares aos efeitos de outros modelos de PC reconhecidos – PC isquêmico (estímulo clássico) e PC químico com ácido 3-nitrotopiônico (3-NP) (Krzyzanowska and Pomierny 2017), o pré-tratamento com CTX consegue explorar outras alternativas em estudos de neuroproteção sob a perspectiva do PC.

Diversos estudos mostraram os efeitos de diferentes protocolos de dose e de tratamento da CTX em modelos experimentais de IC, tanto *in vivo* como *in vitro*

(Krzyzanowska et al. 2016; Krzyzanowska and Pomierny 2017; Yamada and Jinno 2011; Lee et al. 2008; Lipski et al. 2007). Alguns trabalhos avaliaram propriedades antioxidantes (Altas et al. 2013; Verma et al. 2010) ou mesmo anti-inflamatórias (Lujia et al. 2014) da CTX. Entretanto, por ter uma característica modulação sobre o sistema glutamatérgico, o enfoque da maioria dos estudos se dá sobre o glutamato e seu papel excitotóxico, deixando sua função na interação astrócito-neurônio e no metabolismo intermediário cerebral pouco explorada.

1.5.2. Mecanismos envolvidos no PC

A IT é alcançada tanto por meio da atenuação de mecanismos de dano, quanto por ativação de vias de sobrevivência celular por meio da estimulação de mecanismos endógenos de reparo que restringem a extensão da lesão e facilitam a recuperação da função cerebral (Gidday 2006; Lehotsky et al. 2009). Sabe-se que os mecanismos envolvidos no PC envolvem uma ampla gama de moléculas, células e respostas sistêmicas, como demonstrado por estudos anteriores (Abbott, Ronnback, and Hansson 2006; Stetler et al. 2014; Dirnagl, Becker, and Meisel 2009). Entretanto, o enfoque desta tese é direcionado para alterações metabólicas e, portanto, os próximos parágrafos estão restritos a esse interesse.

Especula-se que o PC cause um estado de depressão metabólica, e que esta teria um papel na IT. A depressão metabólica é uma adaptação a condições ambientais extremas observadas na natureza e, por isso, os mecanismos envolvidos foram bem conservados durante a evolução. A depressão metabólica já foi observada em alguns tipos de PC não-farmacológicos, como hipotermia terapêutica e condicionamento por breves períodos de isquemia, também conhecido como PC isquêmico (IPC). Dependendo do estímulo, o PC pode alterar o perfil transcriptômico de ratos, causando uma supressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose, reciclagem (*turnover*) de proteínas, canais iônicos (Stenzel-Poore, Stevens, and Simon 2004; Stenzel-Poore et al. 2003) e, portanto, pode diminuir o consumo energético. Recentemente, Geng e colegas demonstraram uma atenuação da estimulação da glicólise pós-IC, promovendo a utilização de beta-hidroxibutirato em um modelo in vivo de PC (Geng et al. 2018). Ainda, a regulação negativa do

transportador de glicose 1 (GLUT1) mediado por proteína cinase ativada por AMP (AMPK) e 6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bisfosfatase-3 foram associados à flexibilidade metabólica induzida por IPC, indicando que o metabolismo da glicose desempenha um papel importante na neuroproteção por PC. Por exercer uma modulação marcante no sistema glutamatérgico, não se sabe se a Ceftriaxona poderia induzir ou não um estado de depressão metabólica ou mesmo alterar de qualquer forma o metabolismo energético cerebral.

Pelo menos em parte, a IT é baseada na reprogramação dependente do HIF1, responsável por modular o metabolismo celular basal que envolve os genes mitocondriais (Aragones et al. 2008; Fukuda et al. 2007). Conhecido como um sensor do PC, o HIF pode ser o responsável por regular negativamente o metabolismo oxidativo por diminuir a biogênese mitocondrial, estimular a glicólise, reduzir a entrada de metabólitos no ciclo do TCA e promover a otimização respiratória por meio da regulação de subunidades da citocromo oxidase (Fukuda et al. 2007).

1.6. Hipótese de Trabalho

Considerando o que foi exposto acima, podemos observar que: (i) novas abordagens terapêuticas são necessárias para o tratamento do AVE; (ii) modelos animais com oclusão permanente são pouco empregados na pesquisa pré-clínica; (iii) alterações no metabolismo de substratos podem fazer parte da resposta à IC; (iv) a reatividade astrocitária pode estar envolvida nessas alterações; (v) o PC é uma abordagem útil para a elucidação de mecanismos neuroprotetores endógenos; (vi) é possível ativar um fenótipo celular mais resiliente por meio de estímulos exógenos; e (vii) a CTX é conhecida por ter efeitos neuroprotetores em modelos de IC com reperfusão, tendo sido pouco testada em modelos de oclusão permanente. Assim, a hipótese desta tese é que a IC pode promover alterações metabólicas no tecido cerebral com o objetivo de adaptar-se à situação patofisiológica e que tais alterações poderiam persistir se o fluxo sanguíneo não for reestabelecido em seguida. Além disso, foi testada a hipótese de que uma intervenção farmacológica, conhecida por aumentar a captação de glutamato (CTXpre), poderia alterar o metabolismo cerebral

pós-IC, corroborando com nossa conjectura inicial de que as alterações metabólicas fazem parte dos mecanismos de neuroproteção endógenos cerebrais.

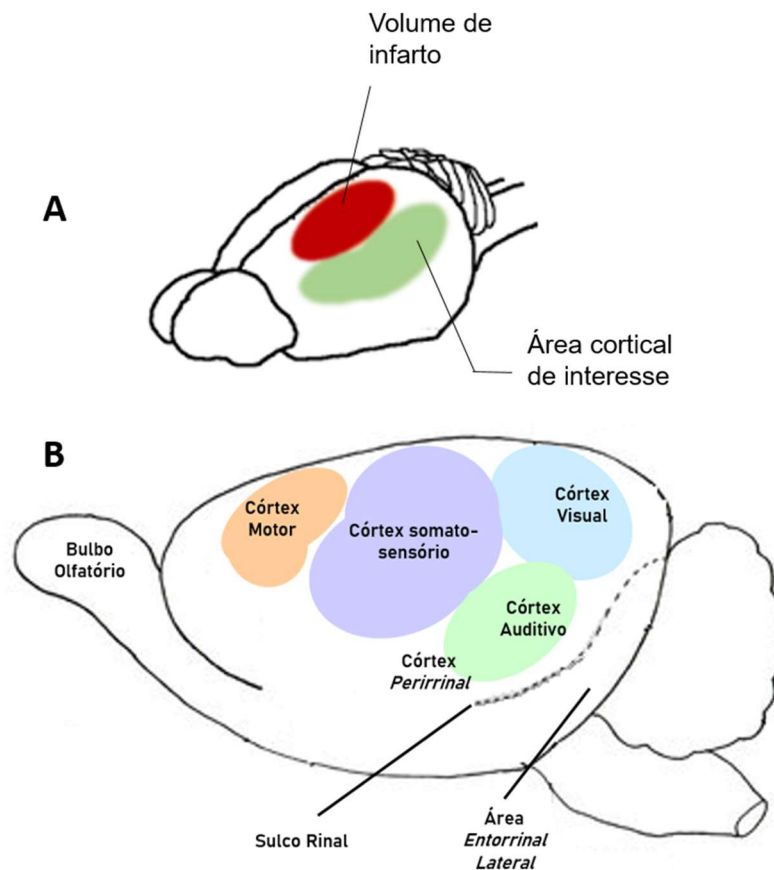


Figura 7. Representação das áreas corticais de interesse dos Capítulos 1 e 2 por estarem envolvidas na lesão ou nas adaptações ativadas pela FPI. (A) Distinção entre a região do *core* isquêmico (em vermelho) da região da penumbra (em verde). (B) Regiões corticais atingidas pela lesão de FPI, bem como as áreas corticais de interesse para avaliação de adaptações bioquímicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar alterações metabólicas cerebrais após a indução de um modelo experimental de isquemia focal permanente (FPI), com enfoque no sistema glutamatérgico, no metabolismo energético, em alterações astrocitárias e em parâmetros comportamentais em ratos adultos.

2.2. Objetivos Específicos

Para o Capítulo 1, os objetivos específicos foram desenvolvidos a partir da caracterização das alterações metabólicas decorrentes da indução do modelo (lesão unilateral) na região da penumbra em ambos os hemisférios cerebrais:

- Observar, por meio de teste comportamental, o déficit motor induzido pelo dano isquêmico no modelo de FPI;
- Medir o volume de infarto decorrente da lesão na fase aguda (2 dias) e subaguda (9 dias) após a indução de FPI;
- Avaliar a expressão dos transportadores GLAST e GLT-1 após a indução de dano isquêmico focal;
- Avaliar a expressão dos transportadores MCT de neurônios e astrócitos (MCT2 e MCT4, respectivamente) após a indução de dano isquêmico focal;
- Avaliar possíveis alterações na captação e oxidação de substratos energéticos após a indução de dano isquêmico focal;
- Avaliar alterações no metabolismo da glicose *in vivo*;
- Avaliar a expressão de GFAP, bem como a morfologia astrocitária;
- Avaliar os níveis de citocinas e fatores tróficos associados à reatividade astrocitária.

Para o Capítulo 2, os objetivos específicos foram desenvolvidos a partir da elaboração de uma intervenção que tivesse o potencial de estimular o metabolismo do glutamato por aumentar sua captação e, conseqüentemente, sua disponibilidade intracelular em astrócitos, durante a indução do modelo de FPI:

- Observar os efeitos de um pré-tratamento com Ceftriaxona (CTXpre) no volume de infarto após indução de dano isquêmico focal;
- Avaliar o efeito do CTXpre na expressão de GLT-1 e na atividade de captação de glutamato em um modelo de oclusão permanente (FPI);
- Observar os efeitos do dano isquêmico induzido pelo modelo de FPI e do CTXpre na performance motora e cognitiva de ratos Wistar adultos submetidos ao dano isquêmico induzido pelo modelo de FPI a longo prazo;
- Avaliar o efeito do dano isquêmico induzido pelo modelo de FPI e do CTXpre sobre a liberação de glutamato do terminal pré-sináptico;
- Avaliar os possíveis efeitos do dano isquêmico induzido pelo modelo de FPI e do CTXpre sobre a oxidação de substratos energéticos;
- Avaliar o efeito do dano isquêmico induzido pelo modelo de FPI e do CTXpre sobre a atividade e imunoconteúdo enzima GS;
- Avaliar o efeito do dano isquêmico induzido pelo modelo de FPI e do CTXpre sobre o conteúdo de GSH;
- Avaliar os possíveis efeitos do dano isquêmico induzido pelo modelo de FPI e do CTXpre nos níveis de aminoácidos no líquido cefalorraquidiano (LCR);

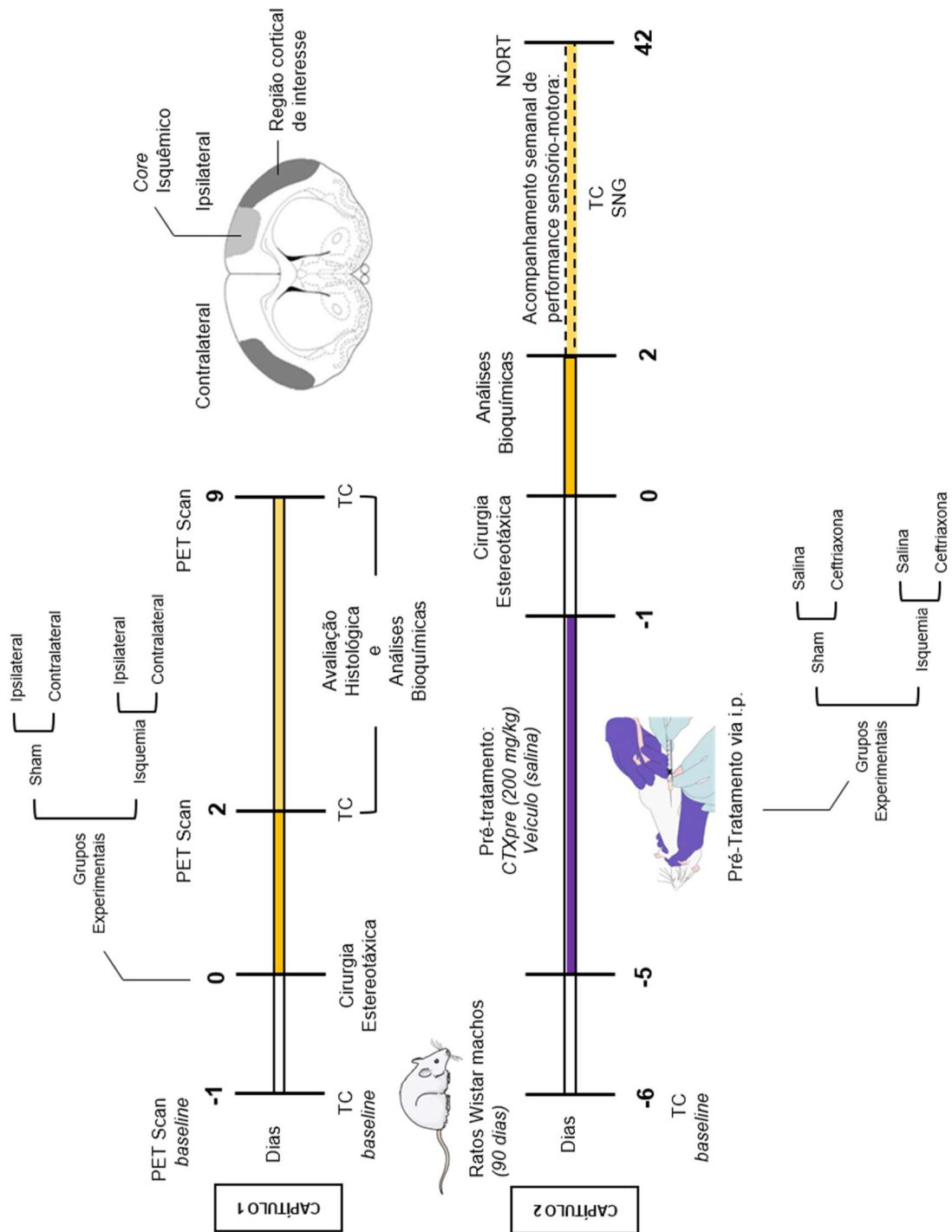


Figura 8. Esquema representando os diferentes desenhos experimentais utilizados em cada Capítulo da presente tese. Abreviações: CTXpre, pré-tratamento com Ceftriaxona; TC, teste de cilindro; PET, tomografia por emissão de pósitrons, SNG, score neurológico de García.

PARTE II

3. RESULTADOS

3.1. CAPÍTULO 1

Cortical Bilateral Adaptations in Rats Submitted to Focal Cerebral Ischemia: Emphasis on Glial Metabolism

Status: Publicado.

Molecular Neurobiology March 2018, Volume 55(3), pp 2025-2041

(*Impact Factor: 4.5*)

Direitos autorais deste trabalho cedidos mediante publicação para o
periódico científico *Molecular Neurobiology*

DOI: 10.1007/s12035-017-0458-x

Principais contribuições do Capítulo 1

Dentre os resultados obtidos, destacam-se:

- 1.** O modelo experimental de FPI é unilateral, mas resulta em alterações ipsi- e contralaterais à lesão;
- 2.** A FPI provocou modulações no hemisfério ipsilateral que persistem, pelo menos, até 9 dias após a lesão; tais adaptações endógenas poderiam desempenhar um papel na recuperação cerebral ou em efeitos deletérios a longo prazo;
- 3.** A análise da oxidação de substratos mostra que a região da penumbra foi capaz de captar e produzir $^{14}\text{CO}_2$, indicando sua viabilidade (e necessidade) metabólica 2 e 9 dias após a indução de FPI;
- 4.** A análise em PET Scan do metabolismo de ^{18}F FDG mostra um hipometabolismo 2 e 9 dias pós-FPI, reforçando a necessidade metabólica observada nos experimentos ex vivo;
- 5.** A captação de glutamato parece estar diretamente relacionada com a oxidação de lactato, uma vez que ambos estão aumentados nos dois hemisférios cerebrais, sugerindo que o glutamato poderia ser convertido em lactato em astrócitos e exportado como suporte energético neuronal.

3.2. CAPÍTULO 2

*Pharmacological preconditioning shifts glutamate metabolic fate after
focal permanent ischemia*

Status: *Manuscrito em preparação.*

A ser submetido para a revista Stroke

(Impact Factor: 7.19)

Pharmacological preconditioning shifts glutamate metabolic fate after focal permanent ischemia.

Nonose, Y.¹, Brochier, A. W.¹, Souza, J.S.¹, Apel, R.V.¹, Malet, S.¹, de Lima, T.M.¹, Rohden, F.¹, Zenki, K.C.¹, Almeida, R.F.¹, Urruth, F.F.¹, Souza, D.O.G.^{1,2}, de Assis, A.M.^{1,3}.

¹ Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo Santa Cecília, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

² Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

³ Graduate Program in Health and Behavior, Center of Health Science, Universidade Católica de Pelotas – UCPel, Pelotas, RS 96015-560, Brazil

Correspondence to:

Yasmine Nonose, MSc

Rua Ramiro Barcelos, 2600

Porto Alegre – RS

Zip Code: 90035-000

E-mail: yasmine.nonose@ufrgs.br

Keywords: Cerebral Ischemia, Energy Metabolism, Ceftriaxone, Astrocyte-Neuron Coupling, Glutamate, Permanent Occlusion, GLT-1

Running title: Ceftriaxone alters energy metabolism after focal ischemia.

Abstract

Background and Purpose: Cerebral ischemia is a leading cause of death and disability worldwide. The absence of effective neuroprotective agents in the clinic has increased the interest in understanding endogenous neuroprotection such as those triggered by preconditioning strategies. Ceftriaxone, a β -lactam antibiotic, is known to stimulate GLT-1 expression, but its putative effects on brain metabolism remain elusive. Therefore, this study evaluated ceftriaxone pretreatment (CTXpre) effects on energy substrates oxidation, glutamatergic parameters, amino acid content and neuroprotection through long-term behavioral assessment after focal permanent ischemia (FPI).

Methods: Adult male Wistar rats were submitted to CTXpre (200 mg/kg, i.p.) or vehicle (saline) for 5 days previously to FPI induction or sham-operated surgery. Neurochemical analysis were performed 2 days after injury, while behavioral assessments were conducted once a week for 6 weeks after surgery.

Results: CTXpre diminished infarct volume and ameliorated motor performance in the medium- and long-term, while preserving short-term memory in the ischemic-pretreated group. Both FPI and CTXpre increased glutamate uptake, but the non-pretreated ischemic group still exhibited high levels of glutamate in cerebrospinal fluid (CSF), suggesting the uptake was inefficient. The ischemic-pretreated group maintained glutamine synthetase (GS) immunocontent and activity, which may have supported glutamate uptake activity. CTXpre abolished FPI-induced hypermetabolism in the peri-infarct area, but increased glutamate oxidation rate in the pretreated-ischemic group. In CSF, amino acid metabolism indicated that glutamate was being oxidized and converted to glutamine, while aspartate was increased only in the ischemic-pretreated group.

Conclusions: These results suggest that CTXpre have reprogrammed cerebral response to ischemia not only by increasing glutamate uptake, but also by shifting glutamate metabolic fate towards oxidation. Glutamate may be a key metabolite through which neural cells optimize energy consumption and, therefore, better handle the energy crisis in permanent occlusion.

Non-standard Abbreviations and Acronyms

CNS: central nervous system

CSF: cerebrospinal fluid

CTX: ceftriaxone

CTXpre: ceftriaxone pretreatment

FPI: focal permanent ischemia

GEM: generalized equation models

GLT-1: glutamate transporter 1

GS: glutamine synthetase

IT: ischemic tolerance

PET: positron emission tomography

TCA: tricarboxylic acid

Introduction

Stroke is the second highest cause of death globally and a leading cause of long-term disability^{1,2}. Ischemic stroke is responsible for approximately 87% of stroke occurrences, being characterized as the interruption of cerebral blood flow due to thrombosis or embolism^{3,4}. Since the brain is one of the most high-energy consuming organs, the lack of oxygen and nutrient supply elicited by ischemia can result in severe brain damage and neurological deficits⁵. The most common clinic manifestations include motor paresis of the upper extremity and deficits in somatic sensations that influence motor task performance^{6,7}. Stroke may also impair cognitive functions, as some patients experience memory disorders shortly after stroke that persists for at least 6 months⁸⁻¹⁰.

The central brain region with compromised blood flow is the ischemic core and represents unsalvageable tissue, as neurons undergo irreversible death. Surrounding this area resides the penumbra, a hypoperfused region that remain quiescent due to collateral blood supply¹¹. Thus, in the acute phase, treatment of stroke focuses on saving as much penumbral tissue as possible. Currently, management of ischemic stroke focuses on rapid reperfusion with the administration of intravenous tissue plasminogen activator, the only approved medical stroke therapy¹². Unfortunately, its utilization is limited to a narrow time window and increases the risk for subsequent hemorrhage¹³. Because of this, it is expected that the development of new and effective therapies are based not on recanalization, but on the enhancement of brain plasticity in the penumbra, as it will have a significant impact on clinical applications¹⁴.

One of the main targets of stroke research is glutamate excitotoxicity, a major contributor to the pathophysiology of cerebral ischemia. The lack of glucose and oxygen results in a decrease in ATP synthesis and, consequently, energy-dependent processes become impaired. The Na⁺/K⁺-ATPase pump can no longer maintain the cell membrane electrochemical gradient and neurons depolarize, releasing a massive amount of glutamate in the synaptic cleft. The consequent over stimulation of glutamate receptors causes excitotoxicity-related cell death and propagation of the infarcted area¹⁵. Extracellular levels of glutamate are controlled by transporters, especially glutamate transporter 1 (GLT-1) found in astrocytes. GLT-1 is the most abundant glutamate transporter in the brain and depends upon the electrochemical gradient maintained by the Na⁺/K⁺-ATPase to drive glutamate from the synaptic cleft to the cytoplasm. During an ischemic insult, the energy deprivation compromises glutamate transport, increasing

even further its concentration in the synaptic cleft and contributing to the progression of the infarct¹⁶⁻¹⁸.

Evolutionary pressure made living organisms develop mechanisms to protect against tissue damage and compensate in the event of injury. Brain ischemia, for causing energy deprivation, constitutes one of most elementary challenges in nature. The brain's resistance to ischemic injury, also known as ischemic tolerance (IT), can be achieved by preconditioning the brain with a non-injurious stimulus that will trigger an adaptive response¹⁹. Although brief cerebral ischemia or hypoxia are the prototypical preconditioning stimuli, IT can also be achieved by a variety of endogenous or exogenous stimuli^{20,21}, providing hope that it may be possible to induce IT pharmacologically in the future.

Ceftriaxone (CTX), a β -lactam antibiotic, selectively increases GLT-1 expression and uptake activity²², showing neuroprotective effects when administered prior to the induction of ischemic injury²³. In vivo, CTX is commonly administered as a pretreatment (100-200 mg/kg, for 5 days), as enhanced glutamate uptake can prevent excitotoxicity-mediated neuronal death during the acute phase of stroke²⁴⁻²⁶. However, some inconsistencies in the literature indicates that the effect of CTX on GLT-1 expression may depend on experimental model, treatment paradigms, animals used and brain regions analyzed²⁵, requiring further investigation. Importantly, glutamate is not only a neurotransmitter, but primarily a key metabolite for brain energetics²⁷⁻²⁹. Previous studies lack information about CTX putative effect on glutamate metabolism after its uptake by GLT-1.

It is generally accepted that the brain lacks considerable metabolic flexibility. Glucose is the obligatory substrate, and the brain is thought to rarely oxidize nonglucose substrates apart from ketone bodies in particular situations (*e.g.*, fasting, strenuous exercise, ketogenic diet, and in neonatal metabolism). Glutamate, the most abundant amino acid in the mammalian central nervous system (CNS), is considered to be compartmentalized within the glutamine-glutamate cycle because of its central role in neurotransmission³⁰, but its metabolism is closely associated with the tricarboxylic acid (TCA) cycle function³¹⁻³³. A study with ¹³C-NMR spectroscopy by Sonnewald et al. first reported that more of the label from glutamate metabolism was incorporated into lactate than converted to glutamine in primary astrocyte culture³⁴, highlighting the energetic contribution of this amino acid to cerebral metabolism. In accordance with it, our research group has recently provided evidence that, shortly after focal permanent

ischemia (FPI), glutamate taken up by astrocytes may be used as carbon source to produce lactate, which could be shuttled to neurons to be oxidized ³⁵.

Preconditioning protocols give us the opportunity to investigate how the brain response to cerebral ischemia can be reprogrammed to withstand drastic changes on substrate availability. As glutamate links neurotransmission with energy metabolism, and considering that CTX pretreatment (CTXpre) is known to improve glutamate uptake activity, we hypothesized that its effects may go beyond glutamate transport and influence its metabolic fate after ischemic injury. To test our hypothesis, we used an experimental model of focal permanent ischemia (FPI), since cerebral ischemia is most permanent in humans ³⁶, and applied a CTXpre known to upregulate GLT-1 ^{24,25,37}. By different methodologies, we examined the modulation of brain energy metabolism in the cerebral region surrounding the ischemic lesion (penumbral zone) ³⁵. In addition, to verify if these putative changes culminated in neurological improvement, we evaluated long-term neuroprotection by motor performance tests and in the novel object recognition test (NORT).

Material and Methods

Ethics

All animal experiments were performed in accordance with the National Institute of Health “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication no. 80-23, revised 1996) and were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Animal Care and Use Committee (process number 31516).

Reagents

2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). For glutamate uptake experiments, glutamic acid, L-[3,4-³H] was purchased from PerkinElmer (Boston, MA, USA). Lactic acid, L-[¹⁴C(U)] sodium salt and Glucose, D-[¹⁴C(U)] were purchased from American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, USA). Glutamic acid, L-[¹⁴C(U)] (#NEC290E250UC) and Optiphase “Hisafe” 3 (#1200-437) scintillation liquid were purchased from PerkinElmer (Boston, MA, USA). Protein quantification was performed with BCA Protein Assay kit from Thermo Fisher Scientific (#23227, Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin as standard. All other reagents were of analytical grade.

Animals

Animals were obtained from the Central Animal House of ICBS – UFRGS. Adult male Wistar rats (90-100 days old, weightening 300-350 g) were housed three to four per cage under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at temperature of 22 ± 2 °C), with water and food pellets available ad libitum.

CTX preconditioning treatment

Animals were divided in four experimental groups: (i) sham-saline (SS); (ii) ischemia-saline; (iii) sham-CTX pretreated (SCTX); and (iv) ischemia-CTX pretreated (ICTX). The animals of the groups SCTX and ICTX were pretreated with CTX as previously described in the literature^{24,25,37}. Briefly, the animals received 200 mg/kg of CTX (Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil)

dissolved in saline, once a day via i.p, for 5 days previously to the induction of FPI. The remaining experimental groups (SS and IS) received only vehicle (saline) (Fig.1A).

Induction of Focal Permanent Ischemia (FPI)

The focal ischemic lesion was induced by blood thermocoagulation of pial vessels over the motor and sensorimotor cortices^{35,38,39}. Briefly, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (70 mg/kg, i.p) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. The skull was surgically exposed, and a craniotomy was performed by exposing the left frontoparietal cortex (+2 to -6 mm A.P. and -2 to -4 mm M.L. from the bregma)⁴⁰. The blood inside the pial vessels was thermocoagulated transdurally by the apposition of a hot probe to the dura mater. After the procedure, the skin was sutured and the body temperature was maintained at 37 °C using a heating pad until recovery from anesthesia. Sham-group animals were only submitted to the aforementioned craniotomy. All animals with apparent surgical damage were excluded from this study.

Behavioral tests

Cylinder Test

The cylinder test was performed to evaluate the sensorimotor performance of each animal after induction of the FPI model. The test is based on the spontaneous exploratory behavior of rodents, and it reveals forelimb preference when the animal rears to explore its environment by making forelimb contact with the cylinder walls (transparent glass apparatus, 200 mm in diameter and 300 mm in height)³⁹. Animals were subjected to one trial 1 day before the beginning of CTXpre and again once a week for 6 weeks after FPI. To prevent habituation to the cylinder, the number of movements recorded was limited to 20. The occurrences of ipsilateral (to the lesion), contralateral or simultaneous forelimb use were counted. The symmetry score for each animal was calculated by a previously described formula⁴¹. For the group IS, only animals with a symmetry score between 0 and 30% were selected for further experiments. We observed that ICTX group symmetry scores were not statistically different from the IS group 2 days post-FPI, so the same rule was applied.

Neurological Score

The animals were also submitted to neurological evaluation in the same time points (post-FPI, once a week for 6 weeks) and their performance was registered according to Garcia *et al.* with some modifications⁴². Briefly, the Garcia neurologic score is a composite neurological test in which the rats were evaluated for various sensorimotor deficits such as: (i) symmetry in four-limb movement; (ii) forepaw outstretching; (iii) climbing; (iv) body proprioception; and (v) response to vibrissae touch. The score given to each rat is the summation of all 5 individual test scores. The minimum neurological score was 3 and the maximum was 15 points, increasing with better performance. The criteria for the attribution of points is depicted in Table S1.

Novel Object Recognition Task (NORT)

The NORT was used to evaluate recognition memory⁴³ on the 42nd day after the induction of the FPI injury. To acclimate the animals to the arena, 90 min before the NORT test an Open Field training session was performed. For this, the animals were individually placed on the periphery of the arena for exploration. In the familiarization phase, the arena contained two identical objects (familiar objects, FO1 and FO2) and the animals were left to explore them for 10 min. Exploration of objects were counted only when the animal's mouth or nose made contact with an object. Since both objects were new, the time spent on both objects was expected to be similar. Then, 90 min later, the first NORT took place and the animals were individually put back into the arena with an FO (the same as in the training session) together with a new object (NO) to assess short-term memory. The second NORT was performed 24 h after. In this task, the animals were placed back into the arena with the FO (the same as in the first NORT) in the same position but with the NO (same test object) in a different position in order to measure long-term memory. The time spent exploring the objects was recorded for 10 min. The task was recorded and analyzed by ANY-maze 6.19 software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). The results were expressed as a percentage of time spent exploring each object during the test session. Animals that recognized the NO as such and explored it for more than 50% of the total time were considered to display successful recognition (Fig. 1F).

Experimental Procedure and Tissue Preparation

Animals were euthanized by decapitation 2 days after surgery, and the following parameters were evaluated: *in vivo* — (1) cylinder test, (2) neurologic score, and (3) NORT; *ex vivo* — (4) lesion size measurement, (5) L-[³H] Glutamate uptake and release, (6) substrate oxidation to ¹⁴CO₂, and (7) Glutamine Synthetase (GS) activity measurement; and *post-mortem* — (8) GLT-1 mRNA expression, (9) GLT-1 and GS immunoccontent, and (10) amino acid dosage in cerebrospinal fluid (CSF). For the *ex vivo* and *post-mortem* experiments, we used a specific region of the cerebral cortex (penumbra), composed by a cerebral cortical cluster (somatosensorial, entorhinal, perirhinal, auditive, and visual cortices), after setting the lesion size by the TTC staining (described below) ³⁵. All analysis were performed in the ipsilateral (lesioned) hemisphere (Fig. 2C).

Lesion Size Measurement

We used TTC staining to delineate the ischemic core region from the peri-infarct area and to measure the infarct volume. Briefly, the brain was rapidly removed from the skull and sectioned in the coronal plane into slices of approximately 2 mm thick using a rat brain matrix (N=7). The slices were immersed for 30 min in a 2% TTC solution at 37 °C followed by overnight fixation in 4% paraformaldehyde (Sigma, St. Louis, MO, USA). After TTC staining, the slices were arranged in a frontal-occipital orientation and digital images were taken. Brain slices were analyzed with ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). The infarct volume was calculated as described previously ^{44,45}. The results are expressed in cubic millimeters.

RNA expression and Quantitative RT-PCR

To evaluate GLT-1 expression, real-time RT-PCR was performed. Total RNA was isolated from the cerebral cortical cluster (N=7) using RNeasy® Protect Mini Kit (#74106, Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland) ⁴⁶. The concentration and purity of the RNA were determined spectrophotometrically at a ratio of 260/280. For cDNA synthesis, 200 ng of total RNA were reverse transcribed with Taqman® Reverse Transcription Reagents Kit (N808-0234, Applied Biosystem, Luzern, Switzerland) with random hexamers as described by the suppliers in a total volume of 50 µL. The PCR reaction was performed with 1 µL of cDNA mixed with the suitable primer (0.3 µM) and the SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Luzern,

Switzerland) in a total volume of 10 μ L. Each sample was tested in duplicate. Quantitative determination of GLT-1 (For, 5'-GAGCATTGCTGCAGCCAGTATT-3'; Rev 5'-GTTCTCATTCTATCCAGC AGCCAG-3'; Microsynth, Balgach, Switzerland) mRNA expression levels was performed with the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Luzern, Switzerland) with β -actin (For, 5'-ATATCGTCATCCATGGCGAAC-3'; Rev 5'-ACCTTCTTGCAGCTCCTCCGT-3'; Microsynth, Balgach, Switzerland) mRNA used as an endogenous control. For data analysis, the raw threshold cycle (CT) value was first normalized to the housekeeping gene for each sample to obtain the Δ CT value. The normalized Δ CT value was then calibrated to the control cell samples to obtain the $\Delta\Delta$ CT value.

Western Blot

For protein immunocontent evaluation, cerebral cortical clusters from all experimental groups were obtained 2 days post-surgery and prepared as previously described, with modifications³⁵. Briefly, cells were solubilized in ice-cold RIPA buffer (0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris, pH 8.0), standardized in sample buffer (62.5 mM Tris-HCL pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromophenol blue), and boiled at 95 °C for 5 min. Separation by SDS-PAGE was performed with 10 μ g of protein per well. After transferring the proteins to a nitrocellulose membrane, adequate loading was confirmed using Ponceau S staining. The membranes were incubated with blocking buffer (5% (w/v) albumin) overnight, followed by incubation with primary polyclonal rabbit antibody overnight at 4 °C (GLT-1, 1:1000 dilution; Glutamine Synthetase, 1:5000 dilution; β -tubulin, 1:1000 dilution). After, the membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (GE Healthcare) secondary antibody for 2 h. Chemiluminescent bands were detected in an ImageQuant LAS4000 system (GE Healthcare) using an enhanced chemiluminescent (ECL) horseradish peroxidase (HRP) substrate from the SuperSignal™ West Pico PLUS kit (Cat. No. 34580, Thermo Scientific) and quantified with ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). The results were expressed in percent of control levels after normalization using β -tubulin as an internal standard.

L-[³H] Glutamate Uptake in Cortical Slices

Brain cortical slices (300 μm , 100-120 mg) were rapidly obtained using a McIlwain Tissue Chopper and immersed in HBSS (in mM: 137 NaCl, 0.60 Na_2HPO_4 , 3.0 NaHCO_3 , 20 HEPES- Na^+ , 5.0 KCl, 0.40 KH_2PO_4 , 1.26 CaCl_2 , 0.90 MgSO_4 , and 5.55 D-glucose, pH 7.2) and preincubated with HBSS at 37 $^\circ\text{C}$ for 15 min, followed by the addition of 0.33 μCi of L-[^3H]-Glutamate. Incubation was stopped after 7 min with two ice-cold washed of 1 mL HBSS. After washing, 0.5 N NaOH was immediately added to the slices and kept overnight. Na^+ -independent uptake was measured using the aforementioned protocol with modifications on the assay temperature (4 $^\circ\text{C}$) and the composition of the medium (N-methyl-D-glucamine instead of NaCl). Na^+ -dependent uptake was measured as the difference between the total uptake and the Na^+ -independent uptake⁴⁷. Incorporated radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Hidex 300 SL, Mikrotek Laborsysteme, Overath, Germany).

Cortical Synaptosomal Preparation

The cerebral cortical tissue of each rat was manually homogenized (small capacity Teflon/glass homogenizer in 10 x mL/g) in 10 mM Tris buffer (pH 7.4) with 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA and 0.25 mM dithiothreitol (DTT). The homogenate (H) was centrifuged in microfuge tubes (1.5 mL per tube) at 1000xg for 10 min at 4 $^\circ\text{C}$, using a fixed-angle rotor. The resulting supernatant (S1) was centrifuged at 11,000 \times g for 20 min at 4 $^\circ\text{C}$ to obtain a synaptosomal-enriched pellet (SP), which was washed twice with HBSS (pH 7.4) by centrifugation at 16,000 \times g for 10 min at 4 $^\circ\text{C}$ to remove sucrose excess. The final pellet was resuspended in HBSS buffer (900 μL)⁴⁸.

Ex vivo L-[^3H] Glutamate Uptake from Cortical Synaptosomal Preparations

To measure glutamate uptake in brain cortex synaptosomes (prior step to measuring its release), 1 $\mu\text{Ci/mL}$ L-[^3H] Glutamate plus 50 μM (final concentration) glutamate was added, and the mixture was incubated for 15 min at 37 $^\circ\text{C}$. The reaction was terminated by four washes of ice-cold HBSS through centrifugation at 14,000 \times g for 1 min at 4 $^\circ\text{C}$. The final pellet was resuspended in HBSS, and an aliquot was separated. The radioactivity of this aliquot was determined using a Hidex 300 SL scintillation radioactivity counter⁴⁸ (Fig. S1).

Ex vivo L-[³H] Glutamate Release from Cortical Synaptosomal Preparations

L-[³H] Glutamate release from synaptosomes as previously described ⁴⁹, with minor modifications. First, the SP was loaded with L-[³H] Glutamate using the *in vitro* L-[³H] Glutamate uptake assay protocol (described above). Basal L-[³H] Glutamate release was initiated by the addition of aliquots of loaded synaptosomes in HBSS buffer at 37 °C for 1 min and stopped by immediate centrifugation (14,000× g for 1 min at 4 °C). The percentage of previously loaded radioactivity present in the supernatant was considered the amount of GLU released. K⁺-stimulated L-[³H] Glutamate release was assayed as described for basal release, except that the incubation medium contained 40 mM KCl (NaCl decreased accordingly) to induce synaptosomal depolarization. The K⁺-stimulated glutamate release was calculated as the delta (Δ) between both glutamate release activities. Glutamate release was increased by approximately 70 % by high K⁺, indicating the viability of our preparations, in comparison with the non-stimulated L-[³H] Glutamate release. Radioactivity was separately determined for supernatants and pellets using a Hidex 300 SL scintillation counter ⁴⁸.

Substrate Oxidation to ¹⁴CO₂

Cerebral cortex slices (300 μm, 100-120 mg) were obtained as described above, transferred into flasks and pre-incubated in Dulbecco's buffer for 30 min. Before incubation with radiolabeled substrates, the reaction medium was gassed with a 95% O₂; 5% CO₂ mixture for 30 seconds. Slices were incubated in 1 mL of Dulbecco's buffer containing either: (i) 5 mM D-Glucose + 0.2 μCi D-[¹⁴C(U)]-Glucose; (ii) 10 μM L-glutamic acid + 0.2 μCi L-[¹⁴C (U)]-Glutamate; or (iii) 10 μM sodium L-Lactate + 0.2 μCi L-[U-¹⁴C]-Lactate. Then, the flasks containing the slices were sealed with rubber caps and plastic film, and incubated at 37 °C for 1 hour in a Dubnoff metabolic shaker (60 cycles/min) as described previously ⁵⁰. The incubation was stopped by adding 0.2 mL 50% trichloroacetic acid through the rubber cap into the flask, while 0.1 mL of 2 N NaOH was injected into the central wells. Thereafter, flasks were shaken for an additional 30 min at 37 °C to trap ¹⁴CO₂. The content of the central wells was transferred to vials and assayed for ¹⁴CO₂ radioactivity in a liquid-scintillation counter. The initial specific activity of the incubation medium was considered for calculations ³⁵.

Amino Acid Quantification by HPLC

For collecting cerebrospinal fluid (CSF) samples (100 μ L per rat), 2 days post-FPI the animals were anesthetized with isoflurane and placed on a stereotaxic apparatus, where a direct puncture of the cisterna magna was performed⁵¹. CSF samples were centrifuged at 1000 g for 10 min, and the supernatant was stored at -80 °C. The quantification of free amino acid levels by High-performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed as described previously⁵². Briefly, each CSF sample was filtered in a Millipore 0.22 μ L filter and the cell-free supernatant aliquots were used to quantify the levels of the following amino acids: aspartate (Asp), glutamate, serine/histidine(Ser/His), glutamine, alanine (Ala), tryptophan (Trp), methionine (Met), valine (Val), phenylalanine (Phe), isoleucine (Ile), leucine (Leu), ornithine and lysine (Lys). The analysis was performed using a reverse phase column (Supelcosil LC-18, 250 mm x 4.6 mm x 5 μ m, Supelco) in a Shimadzu Instruments liquid chromatograph (50 μ L loop valve injection, 40 μ L injection volume) and fluorescent detection after pre-column derivatization with 100.5 μ L OPA (5.4 mg OPA in 1 mL, 0.2 M sodium borate pH 9.5) plus 25.5 μ L 4% mercaptoethanol for 3 minutes. The mobile phase flowed at a rate of 1.4 mL/min and 25 °C column temperature. Buffer composition was: (A) 0.04 mol/L sodium dihydrogen phosphate monohydrate buffer, pH 5.5, containing 80% of methanol; (B) 0.01 mol/L sodium dihydrogen phosphate monohydrate buffer, pH 5.5, containing 20% of methanol. The gradient profile was modified according to the content of buffer B in the mobile phase: 100% at 0.10 min, 90% at 15 min, 48% at 10 min, 100% at 60 min. Absorbance was read at 360 nm and 455 nm, excitation and emission respectively, in a Shimadzu fluorescence detector. Samples of 20 μ L were used and concentration was expressed in μ M. Amino acids were identified by their retention time and were quantitatively determined by using their chromatographic peak area. A known amino acid standard mixture was used for calibration.

Glutamine Synthetase Activity

The glutamine synthetase (GS) enzymatic activity assay was performed as previously described⁵³. Briefly, 0.1 mL of the cell lysate, suspended in 140 mM KCl, was added to 0.1 mL of reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂, 50 L-glutamate, 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4), 10 2-Mercaptoethanol, 50 hydroxylamine-HCl (pH 7.4), and 10 ATP, and incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 mL of a solution containing (in mM):

370 ferric chloride, 670 HCl, and 200 trichloroacetic acid. After centrifugation, the absorbance of the supernatant was measured at 530 nm and compared to the one generated using standard quantities of synthetic γ -glutamylhydroxamate (Sigma) treated with ferric chloride reagent. The controls contained homogenate but lacked ATP. GS activity was expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein/ hour.

Statistical Analysis

For the *ex vivo* and *post-mortem* analysis, the FPI samples and the sham samples were divided in accordance with the pretreatment received (CTXpre or vehicle) and compared by 2-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test, with levels of significance below $P<0.05$. For the behavioral assessment throughout 42 days post-FPI (cylinder test and neurologic score), the statistical analysis was performed using generalized equation models (GEM)⁵⁴ for longitudinal data, adjusting all possible interactions between the factors FPI, CTXpre and Time point (day). The adjusted means were estimated and compared using Tukey test. For the NORT test, we applied unpaired *t* tests with a theoretical average of 50%. The infarct volume was also analyzed by unpaired *t* test, as the sham groups did not exhibit any infarct volume. Data are expressed as mean \pm S.E.M. All graphics and analyses were performed with Prism GraphPad (version 8.01 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com), except the behavioral assessment analysis, which was done using R Software (version 4.0.3).

Results

Behavioral Assessment:

- **FPI injury results in long-term motor performance impairment, which can be improved by CTXpre**

To observe the effect of ischemic insult and the CTXpre in the animals' motor function,, we performed the cylinder test³⁹ and neurological score tests⁴² once a week for six weeks (Fig. 1A).

On the cylinder test, statistical analysis using adjusted GEM revealed significant effect of FPI ($P<0.0001$; $\text{Chi}^2=70.052$) and time point (day of analysis, $P<0.0001$; $\text{Chi}^2=67.040$) when evaluated independently. We observed interactions for both FPI and CTXpre factors with the

time point (FPI: day, $P<0.0001$, $\text{Chi}^2=263.370$; CTXpre: day, $P=0.00301$, $\text{Chi}^2=21.570$). In the multiple comparisons analysis, we observed that sham animals (SS and SCTX) did not present any significant differences in symmetry of forelimb throughout the analysis (all time points, adjusted GEM, Fig. 1B). However, the ischemic groups (IS and ICTX) exhibited an impairment in the contralateral forepaw due to the FPI injury when compared to the control SS, exhibiting a remarkable decrease in their symmetry score in the short- and medium-term (from 2 to 21 days post-FPI, IS: $P<0.0001$; ICTX: $P<0.0001$; 28 days, ICTX: $P=0.0082$; adjusted GEM, $N=10-12$ per group; Fig. 1B). At 35 days post-FPI, the ICTX group presented a significantly improved performance compared to the IS group ($P=0.0026$; adjusted GEM), but was still presenting an impaired symmetry score in comparison to the control SS ($P=0.0094$; adjusted GEM) (Fig. 1B). At 42 days post-FPI, both ischemic groups were still presenting impaired performances in comparison to the SS group (IS: $P<0.0001$; ICTX, $P=0.0029$; adjusted GEM). Despite that during the major part of the evaluation both ischemic groups exhibited similar performances, at the final time point the ICTX group presented 4 animals with full symmetry recuperation (symmetry score $\geq 80\%$), representing 33.33% of ICTX animals ($N=12$), while the IS group did not (Fig. 1D). All means and S.E.M. values are described in detail in Table S2.

In the Neurological Score, statistical analysis using adjusted GEM revealed significant effect of FPI ($P<0.0001$; $\text{Chi}^2=132.1$) and time point (day of analysis, $P<0.0001$; $\text{Chi}^2=70.1$) when the factors were evaluated independently. CTXpre seems to have a significant interaction with FPI injury and time point of the analysis (CTXpre: FPI, $P<0.0001$; $\text{Chi}^2=15.6$; CTXpre: day, $P=0.0064$; $\text{Chi}^2=17.9$). On the other hand, FPI injury exhibited a significant interaction with time point (FPI: day, $P<0.0001$; $\text{Chi}^2=68.9$). In the multiple comparisons, all experimental groups presented a significantly lower score when compared to the control SS 2 days post-FPI (IS: $P<0.0001$; ICTX: $P<0.0001$; SCTX: $P=0.0019$; adjusted GEM for multiple comparisons; $N=10-12$ per group; Fig. 1C). Throughout the analysis, the IS group exhibited the most impaired performance when compared to the SS (all time points, $P<0.0001$, adjusted GEM adjusted GEM for multiple comparisons) or to the ICTX group (Table S3). At 14 days, the ICTX group presented a greater score than the IS group ($P=0.0039$; adjusted GEM for multiple comparisons, Fig. 1C), reaching the peak of motor performance at 21 days post-FPI ($P=0.0004$; adjusted GEM for multiple comparisons, Fig. 1C), when the animals exhibited a similar score to the control group. At 28 days, the ICTX group obtained a higher score than the non-treated animals ($P=0.0051$), but was again impaired in comparison with the control group ($P=0.0021$; adjusted GEM for multiple comparisons). In the long-term (35 and 42 days post-FPI), both ischemic

groups showed a decreased neurologic score in comparison to the control ($P<0.0001$; adjusted GEM for multiple comparisons), but ICTX presented a significant improvement when compared to the IS group (35 days: $P=0.0004$; 42 days: $P<0.0001$; adjusted GEM for multiple comparisons; $N=12$ per group, Fig. 1C). By the end of the analysis, the majority of the animals with full motor recovery (score ≥ 12.5 points) belonged in the ICTX group (7 animals from ICTX group, $N=14$; 2 animals from IS group, $N=13$), while IS animals presented lower score values (Fig. 1E). All means and S.E.M. values are described in detail in Table S3.

- **Short-term memory was perpetually impaired by FPI injury, an effect prevented by CTXpre**

To investigate the effect of FPI injury and CTXpre on short- and long-term memory, we submitted the animals to the NORT at 42 days post-surgery. In the familiarization phase, all the experimental groups explored both FO1 and FO2 equally (Fig. 1G). In the 1st Task, performed 90 min later, all experimental groups showed preference to explore the NO in detriment of the FO, but the IS group (index of exploration time of NO, SS: 61.50 ± 1.94 , $P=0.0003$; SCTX: 60.49 ± 2.41 , $P<0.0001$; IS: 51.93 ± 3.79 , $P=0.1773$; ICTX: 60.65 ± 2.97 , $P<0.0001$; Unpaired t test, $N=10$ per group, Fig.1G). In the 2nd Task, performed 24 h later, all experimental groups recognized the dislocated object (index of exploration time of dislocated NO, SS: 58.89 ± 2.04 , $P<0.0001$; SCTX: 64.23 ± 3.45 , $P<0.0001$; IS: 59.79 ± 2.09 , $P=0.0072$; ICTX: 58.14 ± 2.65 , $P=0.0015$; Unpaired t test, $N=10$ per group, Fig.1G), suggesting that spatial memory is intact and functional in the animals evaluated. Overall, these results indicate that the IS group can form long-term memory, but may have a problem in evocating it in the short-term. The total exploration time (s) for each phase of NORT can be checked on Fig. S2.

Lesion Size Measurement

- **CTXpre reduced infarct volume**

To measure the infarct volume caused by the FPI injury and to investigate the putative effect of CTXpre on this parameter, we performed the TTC staining method 2 days post-surgery. As expected, the FPI induced a well-defined infarct volume (IS: 106.7 ± 2.88 mm³; $N=6$) that included the motor and sensorimotor cortical area, while CTXpre reduced it in approximately 25% (ICTX: 77.96 ± 4.17 mm³, $P=0.0002$; Unpaired t test, $N=6$) (Fig. 2A, 2B). The sham groups (SS and SCTX) did not present infarct volume.

Based on the determination of the infarct volume, we established a cortical area of interest adjacent to the lesioned ischemic core (penumbra) (Fig. 2C), as previously described³⁵. We used this area to investigate short-term neurochemical alterations that may have been responsible for the improved motor recovery in the behavioral long-term assessment.

Effects on Glutamate Transport and Release

- FPI decreased GLT-1 mRNA expression and protein content

To investigate if CTXpre could induce GLT-1 expression in the FPI model, we determined GLT-1 mRNA expression and immunocontent in the cortical area of interest 2 days post-surgery (Fig. 3A, 3B). In the SCTX group, CTXpre was able to increase GLT-1 expression (SS: 1.000 ± 0.13 ; SCTX: 1.449 ± 0.13 , $P=0.0346$; CTXpre factor: $P=0.0370$; $F_{(1, 25)} = 4.855$; 2-way ANOVA, N=7, Fig. 3A) and protein levels (SS: 100.0 ± 4.87 ; SCTX: 122.2 ± 3.47 , $P=0.0195$; CTXpre factor: $P=0.0043$; $F_{(1, 17)} = 9.144$; 2-way ANOVA, N=5, Fig. 3B) when compared to the control SS. In the ischemic groups, the FPI effect seemed to predominate: both IS and ICTX presented a decreased GLT-1 expression (IS: 0.5086 ± 0.03 ; $P=0.0183$; ICTX: 0.5313 ± 0.10 ; $P=0.0204$; FPI factor: $P<0.0001$; $F_{(1, 25)} = 43.38$; 2-way ANOVA, N=7 per group) and immunocontent (IS: 65.78 ± 4.77 , $P=0.0005$; ICTX: 72.90 ± 5.84 , $P=0.0043$; FPI factor $P<0.0001$; $F_{(1, 17)} = 74.08$; 2-way ANOVA, N=5-6 per group).

- Glutamate uptake is increased in both ischemic groups, but only ICTX animals showed normal glutamate levels in the CSF

In order to evaluate CTXpre effect on glutamate uptake in the FPI model, we performed an assay with L-[H³]-Glutamate 2 days post-surgery and measured uptake activity using cortical slices (Fig. 3C). We observed that CTXpre alone had no influence on glutamate uptake and, consequently, SCTX and SS group exhibited statistically similar values (absence of unlabeled glutamate, $P=0.3458$; 2-way ANOVA, Fig 3A). However, in the ischemic groups, we noticed that: (i) FPI alone stimulates glutamate uptake, as shown by the increased transporter activity in both IS and ICTX groups in comparison with the control group (IS: 135.4 ± 12.61 , $P=0.0231$; ICTX: 179.9 ± 14.33 , $P<0.0001$; FPI factor: $P<0.0001$; $F_{(1, 29)} = 65.53$; 2-way ANOVA, Fig.3C); and (ii) CTXpre presented a synergism with the increase caused by ischemia, culminating in a greater uptake activity by the ICTX group in comparison with the IS group ($P=0.0035$; Interaction: $P=0.0006$; $F_{(1, 29)} = 14.80$; 2-way ANOVA, N=7-9 per group, Fig.3C).

Next, we evaluated glutamate levels in the CSF in the same time point to investigate the efficiency of glutamate uptake activity in clearing up the extracellular space. We estimated that glutamate levels of sham groups were similar (SS: 2.033 ± 0.14 ; SCTX: 1.938 ± 0.08 ; 2-way ANOVA, N=7-8 per group). In the IS group, we noticed a great increase in glutamate concentration caused by the FPI injury in comparison to the control (IS: 3.446 ± 0.62 , $P=0.0271$; FPI factor: $P=0.0401$; $F_{(1, 25)} = 4.687$; 2-way ANOVA, Fig. 3D). Interestingly, CTXpre was able to prevent the rise in glutamate levels 2 days post-FPI when compared to the non-treated group (ICTX: 1.977 ± 0.26 , $P=0.0259$; CTXpre factor: $P=0.0282$; $F_{(1, 25)} = 5.430$; 2-way ANOVA, N=7 per group).

- The glutamate release machinery is not altered by FPI injury nor CTX pretreatment in synaptosomal preparations

To evaluate if CTX pretreatment interfered in glutamate release from the pre-synaptic terminal, we obtained synaptosomal preparations from the cortical area of interest and incubated with L-[H^3]-Glutamate in order to fill the synaptic vesicles with a detectable substrate (Fig. S1). After, we proceeded to assay the release amount of the radiolabeled glutamate in basal and K^+ -stimulated synaptosomes. Nevertheless, we did not observe significant changes in glutamate release in either situation (Basal, SS: 0.8660 ± 0.04 ; SCTX: 0.8499 ± 0.07 ; IS: 0.8795 ± 0.06 ; ICTX: 0.8632 ± 0.02 ; Stimulated, SS: 0.7427 ± 0.07 ; SCTX: 0.6931 ± 0.04 ; IS: 0.7055 ± 0.08 ; ICTX: 0.6608 ± 0.05 ; 2-way ANOVA, N=5-7 per group; Fig. 3E, 3F), indicating that the release machinery in synaptosomes was not affected by CTX pretreatment or the FPI injury in terms of functionality.

Metabolic Alterations

- CTXpre prevented the FPI-induced increase in substrate oxidation rate

To investigate how the ischemic injury and/or CTXpre may affect substrate oxidation rate, we performed an assay using radiolabeled substrates and measured the final $^{14}CO_2$ produced in a hermetic-closed vial. The substrates analyzed were D-[(U) ^{14}C]-Glucose (Fig. 4A), L-[(U) ^{14}C]-Glutamic Acid (Fig. 4B), and L-[(U) ^{14}C]-Lactic Acid (Fig. 4C).

In the glucose assay, we observed that CTXpre alone increased glucose oxidation rate when compared to the control (SS: 100.0 ± 3.19 ; SCTX: 123.5 ± 4.33 ; $P=0.0002$), as did the FPI injury (IS: 120.8 ± 3.87 ; $P=0.0004$; 2-way ANOVA). Interestingly, in the ICTX group we

observed that the increase in glucose oxidation was completely prevented when compared to the IS group (ICTX: 104.0 ± 3.15 , $P=0.0059$; Interaction: $P<0.0001$; $F_{(1, 38)} = 34.60$; 2-way ANOVA, N=10 per group), and ICTX animals exhibited statistically similar values to the SS group.

For the glutamate oxidation rate, we observed similar values in sham groups, indicating that CTXpre alone had no effect on this parameter (SS: 100.0 ± 2.95 ; SCTX: 94.02 ± 7.10 ; $P=0.8041$; 2-way ANOVA). In comparison to the control, we observed that FPI injury increased glutamate oxidation drastically (IS: 157.4 ± 5.10 , $P<0.0001$; ICTX: 125.5 ± 6.46 , $P=0.0160$; FPI factor: $P<0.0001$; $F_{(1, 28)} = 59.13$; 2-way ANOVA). However, ICTX animals presented lower values than their non-treated counterparts in the IS group ($P=0.0030$; CTXpre factor: $P=0.0028$; $F_{(1, 28)} = 10.75$; Interaction: $P=0.0329$; $F_{(1, 28)} = 5.035$; 2-way ANOVA, N=8 per group). These data indicate that CTXpre also had an effect on glutamate oxidation rate after FPI.

Finally, we evaluated lactate oxidation rate, and observed that no significant effect of CTXpre in the SCTX group (SS: 100.0 ± 6.81 ; SCTX: 124.4 ± 7.58 ; $P=0.2102$; 2-way ANOVA, N=10 per group). FPI injury increased lactate oxidation rate when compared to the control group (IS: 159.8 ± 11.61 , $P=0.0002$; FPI factor: $P=0.0277$; $F_{(1, 35)} = 5.274$; 2-way ANOVA, N=8), while CTXpre completely prevented this effect in the ICTX group (ICTX: 105.0 ± 9.12 ; $P=0.0007$; Interaction: $P<0.0001$; $F_{(1, 35)} = 20.24$; 2-way ANOVA, N=11).

- FPI impaired the glutamate-glutamine cycle through GS activity, which was prevented by CTX pretreatment.

As CTXpre is known to modulate GLT-1 expression and glutamate uptake, we also investigated other possible routes of glutamate metabolism besides oxidation, including (i) GS immunocontent; (ii) GS activity; and (iii) glutamine levels in CSF (Fig. 5). We observed that CTXpre alone had no effect in SCTX GS protein content when compared to the control (SS: 100.0 ± 5.759 ; SCTX: 101.0 ± 4.73 ; $P>0.9999$; 2-way ANOVA; N=6-7 per group). On the other hand, FPI injury decreased GS protein levels in the IS group (IS: 71.47 ± 5.05 , $P=0.0011$; FPI factor: $P=0.0141$; $F_{(1, 26)} = 7.054$; 2-way ANOVA; N=7), while CTXpre prevented this effect after injury, exhibiting greater protein level when compared to non-treated animals (ICTX: 98.34 ± 5.34 , $P=0.0015$; CTXpre factor: $P=0.0071$; $F_{(1, 26)} = 8.716$; Interaction: $P=0.0109$; $F_{(1, 26)} = 7.673$; 2-way ANOVA, N=7) (Fig. 5A).

In the GS activity assay, we observed that the FPI injury decreased significantly enzymatic activity in the IS group in comparison to the control (SS: 0.091 ± 0.005 ; IS: 0.072 ± 0.004 , $P=0.0146$; FPI factor: $P=0.0059$; $F_{(1, 24)} = 9.113$; 2-way ANOVA). CTX pretreatment was able to prevent this effect in the ICTX group, presenting a greater enzymatic activity than the IS group (ICTX: 0.088 ± 0.006 , $P=0.0414$; CTXpre factor: $P=0.0277$; $F_{(1, 24)} = 5.491$; 2-way ANOVA, N=7-8 per group) and statistically similar values to the control group ($P=0.9628$; Fig. 5B). These results suggest that CTXpre preserves GS protein levels and activity in the post-FPI scenario.

In the quantification of glutamine in the CSF, we observed a similar effect: while the FPI injury decreased glutamine levels in the IS group in comparison to the control (SS: 551.0 ± 14.13 , IS: 384.9 ± 54.57 , $P=0.0001$; FPI factor: $P=0.0002$, $F_{(1, 32)} = 17.99$; 2-way ANOVA; N=8-9 per group), CTXpre prevented this decrease in the ICTX group, presenting higher levels of glutamine in the CSF than the IS group (ICTX: 515.7 ± 30.03 , $P=0.0015$; CTXpre factor: $P=0.0103$, $F_{(1, 32)} = 7.442$; Interaction: $P=0.0159$, $F_{(1, 32)} = 8.364$; 2-way ANOVA; N=9), and statistically similar levels with the control group (Fig. 5C). No difference was found as an effect of CTXpre alone (SCTX: 547.1 ± 18.53 , $P=0.9995$; 2-way ANOVA, N=9). Taken together, these data suggest that glutamine availability may be a part of CTXpre neuroprotective effects.

- Amino acid levels in the CSF were altered by FPI injury and CTX pretreatment 2 days after surgery

To investigate if FPI injury and/or CTXpre could influence amino acid metabolism and, consequently, their concentration in the CSF, we performed an HPLC analysis of the aforementioned fluid 2 days post-surgery. Summary of results are depicted in Fig. 6.

Both FPI and CTXpre had an effect in Ser and/or His (Ser/His) concentrations, presenting higher levels when compared to the control (SS: 84.26 ± 1.28 ; SCTX: 97.92 ± 1.40 , $P=0.0014$; IS: 95.03 ± 2.10 , $P=0.0118$; ICTX: 99.57 ± 2.98 , $P=0.0003$; FPI factor: $P=0.0092$, $F_{(1, 21)} = 8.226$; CTX factor: $P=0.0004$, $F_{(1, 21)} = 14.67$; Interaction: $P=0.0476$, $F_{(1, 21)} = 4.427$; 2-way ANOVA, N=6-7 per group) (Fig. 6A). However, in the analysis of Asp levels, we noticed only an increase in the ICTX group in comparison to the control (SS: 0.5583 ± 0.04 ; ICTX: 0.8248 ± 0.06 , $P=0.0004$; 2-way ANOVA) and to the IS group (IS: 0.5054 ± 0.02 , $P=0.0048$; FPI factor: $P<0.0001$, $F_{(1, 32)} = 20.04$; Interaction: $P=0.0029$, $F_{(1, 32)} = 10.37$; 2-way ANOVA, N=9

per group) (Fig. 6B). Next, we observed that the CTXpre modulated Val levels in the CSF (CTX factor: $P=0.0003$, $F_{(1, 30)} = 16.60$; 2-way ANOVA), culminating in decreased levels for the ICTX group in comparison to the IS group (IS: 3.724 ± 0.23 ; ICTX: 2.980 ± 0.13 , $P=0.0064$; 2-way ANOVA, $N=8-10$ per group).

Discussion

Our results presented evidence on CTXpre putative role in reprogramming brain's response to cerebral ischemia through IT-metabolic adaptations. These changes culminated in a greater neurological improvement and prevention of short-term memory loss in a 6-weeks-long evaluation. The FPI injury resulted in a greater infarct volume and poor motor performance in the IS group, probably due to inefficient glutamate uptake and impaired glutamate-glutamine cycle. These alterations compromised glutamate metabolic handling in the short-term, and the damaging effects were still visible 42 days after in the IS behavioral assessment. On the other hand, CTXpre alone increased GLT-1 expression, glucose oxidation and Ser/His levels in CSF, but had no other effects in the sham animals (SCTX). In the ischemic pretreated group (ICTX), CTXpre improved glutamate handling by shifting its fate to oxidation and maintaining glutamate-glutamine cycle through GS activity. These changes may have a synergistic effect on glutamate uptake, making it more efficient and maintaining astrocyte-neuron metabolic coupling, which ultimately resulted in a smaller infarct volume and greater functional recovery (Fig. 7).

During the course of 6 weeks, we observed only subtle improvements until days 28 and 35, and by the end of the evaluation only one-third of ICTX animals exhibited symmetry scores similar to the control group (Fig. 1D). This may be due to the nature of the cylinder test, which only offers a single output on forelimb preference. For this reason, we also submitted the animals to the García's neurological assessment, as it has the advantage of scoring the degree of damage caused by induced cerebral ischemia within each sensorimotor category⁵⁵, being able to capture incremental severity. In the neurological score, all groups (SCTX, IS and ICTX) exhibited an impaired performance compared to the control group 2 days post-surgery (Fig. 1C). The FPI injury had a great influence in this result, corroborating the cylinder test findings at this early time point. On the other hand, SCTX scores indicated that the pretreatment might

have a discrete, temporarily effect on motor performance, but not detrimental. During the time of the analysis, we observed that CTXpre had a positive influence on motor recovery in the medium- and long-term. Our data demonstrated that the ICTX group showed a clear progressive functional recovery and the majority of the animals exhibited a performance similar to the control group by the end of 6 weeks (Fig. 1C, 1E). The IS group presented a slower recover, ending up with poorer scores (Fig. 1D). Evidence suggests that neurological repair may occur through brain reorganization or, alternatively, through a compensatory mechanism activated by an initial contralesional activity⁶. However, a recent meta-analysis concluded that a good functional outcome relies on the recruitment of the original functional network rather than on compensation⁵⁶. Here, our results indicate that the early neurochemical alterations elicited by CTXpre may facilitate the reorganization of the original functional network, thus enhancing long-term motor rehabilitation in ICTX group.

We also tested the animals on learning and memory through NORT, as its results may be influenced by cortical lesions⁵⁷. On the 1st task, only the IS group could not recognize the novelty after a short retention period (90 min). On the 2nd task, however, all groups recognized the dislocated NO, indicating that long-term memory was formed and hippocampal function was intact (Fig. 1G). Cortical regions in the median temporal lobe are highly integrated with the hippocampus, with the perirhinal cortex being related to recognition after short retention intervals⁵⁸. In this study, we observed that these cortical areas, despite structurally viable, exhibited an impaired energy metabolism shortly after ischemia in the IS group (Fig. 2C; see below). These alterations can persist in the ipsilateral hemisphere at least until 9 days post-FPI, as shown previously by our group³⁵. It is possible that this energetic dysfunction in the IS group could have impaired the integrity of the median temporal lobe and, consequently, compromised the animals' short-term memory⁵⁹. On the other hand, the ICTX group recognized the NO in the 1st task, demonstrating that CTXpre prevented this damage and, as a result, the animals could evocate short-term memory.

Previous studies have shown that CTXpre (100-200 mg/kg/day, 5 days, via i.p.) is neuroprotective through upregulation of GLT-1 expression and uptake activity²², resulting in reduction of infarct volume in ischemic models. These changes were reported in different experimental models: middle cerebral artery occlusion^{60,61}, transient forebrain ischemia⁶² and global ischemia⁶³, usually after a period of reperfusion. Although we observed a decreased infarct volume, CTXpre could not prevent GLT-1 downregulation shortly after FPI induction

(Fig. 3A, 3B, no differences between IS and ICTX groups). Considering that (i) the SCTX group exhibited increased GLT-1 mRNA and protein levels; and (ii) the damage induced by the FPI model does not include reperfusion, these data may indicate that CTXpre cannot prevent GLT-1 diminishment on transcriptional and translatable levels in permanent ischemia. In the ischemic core, GLT-1 may contribute to the increase of extracellular glutamate, as its transport is electrogenic and can operate in reverse⁶⁴. Thus, it is possible that, by inducing a permanent occlusion, the adjacent area to the core downregulated GLT-1 to prevent glutamate overflow. These data suggests that: (i) CTXpre may have prevented the over-expansion of the infarcted area; and (ii) reperfusion may be critical for the upregulation of GLT-1 expression in ischemic models.

Despite downregulating GLT-1 expression, FPI enhanced glutamate uptake and showed a synergism with CTXpre (Fig. 3C). Glutamate clearance seemed to be more efficient in pretreated animals, as IS group exhibited increased glutamate levels in the CSF, while ICTX presented similar values to the control groups (Fig. 3D). Interestingly, CTXpre did not seem to affect release from presynaptic terminals (Fig. 3E, 3F), as our data showed no alteration on the glutamatergic release machinery shortly after ischemia and, in this context, GLT-1 enhanced transport activity might be responsible for the accounted neuroprotection. It is possible that CTX present an independent modulation of glutamate transporters activity, as suggested previously^{65,66}, but we cannot rule out other mechanisms that regulate uptake kinetics. It is known that glutamate transporters are inhibited by reactive oxygen species and products of lipid peroxidation, since they are regulated by a redox mechanism⁶⁷. Previous studies suggested that β -lactam antibiotics have antioxidant potential in cerebral ischemic damage and enhance GSH-Px and SOD levels^{68,69}, improving glutamate transport. However, our results showed that CTXpre also modulated energy substrates metabolism after ischemia, especially glutamate (see below), which may have contributed to its continuous transport into the cell.

In this study, we also evaluated energy metabolism through substrate oxidation in cortical slices and amino acid levels in CSF. The FPI injury increased substrates oxidation in non-treated animals (IS), as previously demonstrated⁷⁰. This hypermetabolism in the peri-infarct area may be related to excitotoxic stimulation of NMDA receptor, as the antagonist MK-801 seems to prevent it⁷¹. Our results indicate that the machinery for oxidizing substrates is functional and over activated due to local energy requirements (Fig. 4A, 4B, 4C). Our results demonstrated that CTXpre increased glucose oxidation rate in the SCTX group, indicating that,

when administered as a pretreatment, glycolysis may be induced as well. A previous study demonstrated that CTXpre can influence glucose metabolism when administered acutely, increasing glucose utilization in response to increased glutamate uptake by GLT-1 activity⁷². However, we did not observe an increase in glutamate uptake in the SCTX group (Fig. 3C), but it may be due to the lack of unlabeled glutamate in the assay, or even to the different preincubation times. CTXpre-induced expression of GLT-1 may involve the activation of NFkB signaling pathway⁶⁹, which may be related to regulation of glycolysis and mitochondrial metabolism, but further investigation is needed to understand whether this result on glucose oxidation is influenced by glutamate uptake or may be a single feature of CTXpre.

Besides the increase in glutamate uptake, we wanted to investigate if its increased availability inside the cells (putative astrocytic cells) would also increase its oxidation rate. Interestingly, CTXpre prevented completely the increase in the oxidative metabolism for glucose and lactate after FPI, but only partially for glutamate (Fig. 4B). This result suggests that CTXpre may have modulated neural cells to preferentially increase reliance on glutamate to fuel energetics and anaplerosis, a task usually held by glucose⁷³. A previous study performed in neuronal culture demonstrated that, when glucose is unavailable to mitochondrial metabolism, glutamate is the preferred substrate because it can add net carbon to the TCA cycle⁷⁴. Collectively, these data indicate that CTXpre influence pathways that elicit metabolic flexibility in the brain, optimizing metabolism through glutamate metabolic handling.

GS is a critical enzyme for the regulation of glutamate synaptic levels and is localized chiefly to astrocytes, but data regarding its role in stroke models is controversial^{75,76}. After FPI, we observed a downregulation of GS immunoccontent and enzymatic activity, which compromised glutamine synthesis in the IS group (Fig. 5A, 5B, 5C). This enzyme is thought to be sensitive to oxidative stress generated during stroke⁷⁶, which may explain the decrement observed. The loss of GS would be expected to increase glutamate levels in CSF, as observed in IS group (Fig. 3D). On the other hand, CTXpre prevented these effects, sustaining glutamine levels in CSF. Increased GS expression/activity are known to support neuronal survival in the injured brain⁷⁷. In this scenario, we hypothesized that CTXpre may have increased GLT-1 transport activity by preserving GS, as GLT-1 protein levels were compromised. Our results provided further evidence that this enzyme can be used as a tool to enhance glutamate uptake⁶⁰ and that CTXpre effects on glutamate transport may be indirect in permanent occlusion models.

As amino acids, especially glutamate, are closely related to the TCA cycle, we evaluated their levels in CSF by HPLC. We observed an increase in the Ser/His peak in all experimental groups when compared to the control (SS). This effect seems to be caused not only by FPI injury, but also by CTXpre (Fig. 6A). It is important to mention that the HPLC method cannot separate Ser and His' peaks from one another, hence the result could be due to each amino acid individually, or the pair of them. However, we must consider other evidence. For example, it is known that His is not synthesized in the brain, but actively transported by blood-brain barrier⁷⁸. In the CNS, His dipeptides have an antioxidant role against reactive species of lipid peroxidation, but its whole function is still poorly understood⁷⁹. On the other hand, Ser participates in astrocyte-neuron metabolic coupling, being related to glycolysis and glutamatergic transmission. D-Ser is known as an essential co-agonist with glutamate for stimulation of NMDA receptors and its synthesis is negatively correlated with glycolytic flux in astrocytes⁸⁰. On the contrary, L-Ser biosynthesis is positively correlated with the glycolysis and uses 3-phosphoglycerate as precursor. Despite HPLC data cannot provide the information about which isomer is present, we can infer that it may be L-Ser, as both FPI and CTX are known to increase glycolytic flux: the first due to hypoperfusion and decrease in oxidative phosphorylation *in vivo*^{81,82}, and the second one for increasing glutamate uptake⁷². The inhibition of serine racemase, responsible for the conversion of L-Ser to D-Ser, by increased glycolytic activity would corroborate with lower activation of NMDA receptors due to increased glutamate uptake and absence of co-agonist. Together with the preservation of GS, this hypothesis reinforces that CTXpre main target is astrocyte metabolism and that this cell type may be crucial for IT.

Interestingly, the biosynthesis of (L-)Ser was pointed out as a cytoplasmic alteration that indicated enhanced glutamate oxidation in neuronal culture⁷⁴. When glucose-derived pyruvate is not available for mitochondrial metabolism, glutamate intracellular levels decreases significantly, while Asp levels increase. These changes indicate that glutamate is the substrate of choice to substitute glycolysis, probably because of its ability to add net carbon to the TCA cycle, maintaining anaplerosis and bioenergetics status. The shift of glucose metabolism to Ser synthesis suggest a more reduced cytoplasm, which may help drive glutamate oxidation by making the malate-aspartate shuttle more energetically favorable⁷⁴. In agreement, our findings indicated an increase in Asp levels in CSF of CTX-pretreated animals submitted to FPI (ICTX group; Fig. 6B). Together with the decrease in glucose oxidation (Fig. 4A), increased Asp levels suggest that glutamate might enter the TCA cycle by the reaction of aspartate aminotransferase

(AAT), an enzyme known to be a neuronal feature in glutamine oxidation⁸³. It seems that CTXpre drives glutamate for oxidation, attenuating metabolic dysfunction by decreasing lactate production and enhancing glutamate catabolism after ischemia.

It is known that branched-chain amino acids (BCAAs, *i.e.*, Leucine, Isoleucine and Valine) might serve in the brain as important donors of amino groups for glutamate synthesis⁸⁴. BCAA transaminase activity is abundant in the brain and neurons have a great capacity to oxidize BCAAs. In this study, we observed a decrease in Val levels in the ICTX group shortly after FPI, indicating an increased catabolism for this amino acid when compared to the IS group. Val can be converted to its alpha-keto acid by transamination and, after a series of reactions, can enter the TCA cycle as succinil-CoA. A previous study by Bak *et al*⁸⁵ demonstrated that Val, rather than Leu or Ileu, was capable of maintaining neurotransmitter pools of glutamate in response to repeated depolarization in cerebellar neurons. Thus, we hypothesize that CTXpre may drive Val to oxidation and/or maintain glutamate pool shortly after FPI.

In conclusion, we observed that CTXpre reprogrammed the cerebral response to ischemia, resulting in a neuroprotective effect that goes beyond glutamate uptake activity and involves shifting glutamate's metabolic fate towards oxidation. Our data showed that CTXpre preserved pathways that improved glutamate handling to optimize brain metabolism, suggesting that glutamate may be a key metabolite in the control of energy usage in IT. Ultimately, these alterations demonstrate that CTXpre modulate glutamate metabolism and, consequently, reduced neurological damage, and facilitated functional recovery. CTXpre induced effects might provide a novel neuroprotective strategy against glutamate excitotoxicity in cerebral ischemia.

Acknowledgements

We would like to thank the Núcleo de Assistência Estatística from UFRGS for the supervision of the statistical analysis.

Funding information

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process number 141229/2016-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERENCES

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:399–410.
2. Campbell BC V, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwamm LH, Davis SM, Donnan GA. Ischaemic stroke. *Nat. Rev. Dis. Prim.* [Internet]. 2019;5:70. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
3. Ovbiagele B, Nguyen-Huynh MN. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2011;8:319–329. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21691873>
4. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135:e146–e603.
5. Lee RHC, Lee MHH, Wu CYC, Couto E Silva A, Possoit HE, Hsieh T-H, Minagar A, Lin HW. Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regen Res* [Internet]. 2018;13:373–385. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29623912>
6. Hatem SM, Saussez G, Della Faille M, Prist V, Zhang X, Dispa D, Bleyenheuft Y. Rehabilitation of Motor Function after Stroke: A Multiple Systematic Review Focused on Techniques to Stimulate Upper Extremity Recovery. *Front. Hum. Neurosci.* [Internet]. 2016;10:442. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27679565>
7. Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M, Bouet V. On the importance of long-term functional assessment after stroke to improve translation from bench to bedside. *Exp Transl Stroke Med* [Internet]. 2011;3:6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21682914>
8. Surawan J, Sirithanawutichai T, Areemit S, Tiamkao S, Saensak S. Prevalence and factors associated with memory disturbance and dementia after acute ischemic stroke. *Neurol. Int.* [Internet]. 2018;10:7761. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30344965>
9. Tan HH, Xu J, Teoh HL, Chan BP, Seet RC, Venketasubramanian N, Sharma VK, Chen CL, Dong Y. Decline in changing Montreal Cognitive Assessment (MoCA) scores is associated with post-stroke cognitive decline determined by a formal neuropsychological evaluation. *PLoS One*. 2017;12:e0173291.
10. Mellon L, Brewer L, Hall P, Horgan F, Williams D, Hickey A, group A-S study. Cognitive impairment six months after ischaemic stroke: a profile from the ASPIRE-S study. *BMC Neurol.* [Internet]. 2015;15:31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25879880>
11. Minnerup J, Sutherland BA, Buchan AM, Kleinschnitz C. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2012;13:11753–11772. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23109881>
12. Onwuekwe I, Ezeala-Adikaibe B. Ischemic stroke and neuroprotection. *Ann. Med. Health Sci. Res.* [Internet]. 2012;2:186–190. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23439855>
13. Zivin JA. Acute stroke therapy with tissue plasminogen activator (tPA) since it was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Ann Neurol*. 2009;66:6–10.
14. Ramos-Cabrer P, Campos F, Sobrino T, Castillo J. Targeting the ischemic penumbra. *Stroke*. 2011;42:S7-11.
15. Mayor D, Tymianski M. Neurotransmitters in the mediation of cerebral ischemic injury. *Neuropharmacology*. 2018;134:178–188.
16. Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 2000;32:1–14.

17. Phillis JW, Ren J, O'Regan MH. Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res.* 2000;880:224.
18. Bonde C, Sarup A, Schousboe A, Gegelashvili G, Zimmer J, Noraberg J. Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem Int.* 2003;43:371–380.
19. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:437–448.
20. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 2003;26:248–254.
21. Wang Y, Reis C, Applegate 2nd R, Stier G, Martin R, Zhang JH. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or post-stroke. *Exp Neurol.* 2015;272:26–40.
22. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* 2005;433:73–77.
23. Hu Y-Y, Xu J, Zhang M, Wang D, Li L, Li W-B. Ceftriaxone modulates uptake activity of glial glutamate transporter-1 against global brain ischemia in rats. *J Neurochem.* 2014;132.
24. Inui T, Alessandri B, Heimann A, Nishimura F, Frauenknecht K, Sommer C, Kempfski O. Neuroprotective effect of ceftriaxone on the penumbra in a rat venous ischemia model. *Neuroscience.* 2013;242:1–10.
25. Krzyzanowska W, Pomierny B, Budziszewska B, Filip M, Pera J. N-Acetylcysteine and Ceftriaxone as Preconditioning Strategies in Focal Brain Ischemia: Influence on Glutamate Transporters Expression. *Neurotox Res.* 2016;29:539–550.
26. Kim SY, Jones TA. The effects of ceftriaxone on skill learning and motor functional outcome after ischemic cortical damage in rats. *Restor Neurol Neurosci.* 2013;31:87–97.
27. Villa RF, Gorini A, Hoyer S. Effect of ageing and ischemia on enzymatic activities linked to Krebs' cycle, electron transfer chain, glutamate and aminoacids metabolism of free and intrasynaptic mitochondria of cerebral cortex. *Neurochem Res.* 2009;34:2102–2116.
28. Villa RF, Gorini A, Ferrari F, Hoyer S. Energy metabolism of cerebral mitochondria during aging, ischemia and post-ischemic recovery assessed by functional proteomics of enzymes. *Neurochem Int.* 2013;63:765–781.
29. McKenna MC. Glutamate pays its own way in astrocytes. *Front Endocrinol.* 2013;4:191.
30. Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol.* 2013;4:102.
31. Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr.* 2000;130:1026s–31s.
32. Yudkoff M, Daikhin Y, Horyn O, Nissim I, Nissim I. Ketosis and brain handling of glutamate, glutamine, and GABA. *Epilepsia.* 2008;49 Suppl 8:73–75.
33. McKenna MC. Substrate competition studies demonstrate oxidative metabolism of glucose, glutamate, glutamine, lactate and 3-hydroxybutyrate in cortical astrocytes from rat brain. *Neurochem Res.* 2012;37:2613–2626.
34. Sonnewald U, Westergaard N, Petersen SB, Unsgard G, Schousboe A. Metabolism of [U-13C]glutamate in astrocytes studied by 13C NMR spectroscopy: incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the tricarboxylic acid cycle. *J Neurochem.* 1993;61:1179–1182.
35. Nonose Y, Gewehr PEE, Almeida RFF, da Silva JSS, Bellaver B, Martins LAMA, Zimmer ERR,

- Greggio S, Venturin GTT, Da Costa JCC, et al. Cortical Bilateral Adaptations in Rats Submitted to Focal Cerebral Ischemia: Emphasis on Glial Metabolism. *Mol Neurobiol*. 2018;55.
36. Yu M, Xue Y, Liang W, Zhang Y, Zhang Z. Protection mechanism of early hyperbaric oxygen therapy in rats with permanent cerebral ischemia. *J Phys Ther Sci*. 2015;27:3271–3274.
 37. Krzyzanowska W, Pomierny B. Ceftriaxone- and N-acetylcysteine-induced brain tolerance to ischemia: Influence on glutamate levels in focal cerebral ischemia. 2017;12:e0186243.
 38. Szele FG, Alexander C, Chesselet MF. Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J Neurosci*. 1995;15:4429–4448.
 39. Hansel G, Ramos DB, Delgado CA, Souza DG, Almeida RF, Portela L V, Quincozes-Santos A, Souza DO. The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. *PLoS One*. 2014;9:e90693.
 40. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / George Paxinos, Charles Watson. Sydney: Academic Press; 1986.
 41. de Vasconcelos Dos Santos A, da Costa Reis J, Diaz Paredes B, Moraes L, Jasmin, Giraldi-Guimaraes A, Mendez-Otero R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Res*. 2010;1306:149–158.
 42. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*. 1995;26:627–34; discussion 635.
 43. Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, Ribeiro FC, Costa C V, Melo HM, Mota-Sales AP, Saraiva LM, Klein WL, Sebollela A, et al. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight abeta oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. *J Neurosci*. 2013;33:9626–9634.
 44. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990;10:290–293.
 45. Liu S, Zhen G, Meloni BP, Campbell K, Winn HR. RODENT STROKE MODEL GUIDELINES FOR PRECLINICAL STROKE TRIALS (1ST EDITION). *J Exp Stroke Transl Med*. 2009;2:2–27.
 46. Rosafio K, Pellerin L. Oxygen tension controls the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured mouse cortical astrocytes via a hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated transcriptional regulation. *Glia*. 2014;62:477–490.
 47. Thomazi AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wofchuk ST. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev*. 2004;125:475–481.
 48. Almeida RF, Comassetto DD, Ramos DB, Hansel G, Zimmer ER, Loureiro SO, Ganzella M, Souza DO. Guanosine Anxiolytic-Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems. *Mol Neurobiol*. 2017;54:423–436.
 49. Tavares RG, Schmidt AP, Abud J, Tasca CI, Souza DO. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. *Neurochem Res*. 2005;30:439–444.
 50. Ferreira GC, Tonin A, Schuck PF, Viegas CM, Ceolato PC, Latini A, Perry ML, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, et al. Evidence for a synergistic action of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids disturbing rat brain energy metabolism. *Int J Dev Neurosci*. 2007;25:391–398.
 51. Almeida RF, Comassetto DD, Ramos DB, Hansel G, Zimmer ER, Loureiro SO, Ganzella M, Souza DO. Guanosine Anxiolytic-Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems. *Mol Neurobiol*. 2017;54:423–436.
 52. Marsden MHJ and CA. Amino acid and small peptides. In: Lim CK, editor. HPLC of Small Peptides.

- Oxford: IRL Press; 1986. p. 13–27.
53. Petito CK, Chung MC, Verkhovsky LM, Cooper AJL. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* [Internet]. 1992;569:275–280. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689939290639Q>
 54. Guimarães LSP, Hirakata VN. Uso do Modelo de Equações de Estimativas Generalizadas na análise de dados longitudinais. *Clin. & Biomed. Res. Vol 32, No 4 Rev. HCPA* [Internet]. 2013; Available from: <https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/36971>
 55. Modo. Long-term survival and serial assessment of stroke damage and recovery - practical and methodological considerations. *J Exp Stroke Transl Med.* 2009;
 56. Rehme AK, Grefkes C. Cerebral network disorders after stroke: evidence from imaging-based connectivity analyses of active and resting brain states in humans. *J. Physiol.* [Internet]. 2013;591:17–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23090951>
 57. Clark RE, Zola SM, Squire LR. Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus. *J. Neurosci.* [Internet]. 2000;20:8853 LP – 8860. Available from: <http://www.jneurosci.org/content/20/23/8853.abstract>
 58. Reger ML, Hovda DA, Giza CC. Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. *Dev. Psychobiol.* 2009;51:672–678.
 59. Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2004;82:26–34.
 60. Verma R, Mishra V, Sasmal D, Raghubir R. Pharmacological evaluation of glutamate transporter 1 (GLT-1) mediated neuroprotection following cerebral ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 2010;638:65–71.
 61. Chu K, Lee ST, Sinn DI, Ko SY, Kim EH, Kim JM, Kim SJ, Park DK, Jung KH, Song EC, et al. Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation. *Stroke.* 2007;38:177–182.
 62. Ouyang YB, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci.* 2007;27:4253–4260.
 63. Hu YY, Xu J, Zhang M, Wang D, Li L, Li WB. Ceftriaxone modulates uptake activity of glial glutamate transporter-1 against global brain ischemia in rats. *J Neurochem.* 2015;132:194–205.
 64. Krzyzanowska W, Pomierny B, Filip M, Pera J. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? *Acta Pharmacol Sin.* 2014;35:444–462.
 65. Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D, Donnelly D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience.* 2007;146:617–629.
 66. Thone-Reineke C, Neumann C, Namsolleck P, Schmerbach K, Krikov M, Schefe JH, Lucht K, Hortnagl H, Godes M, Muller S, et al. The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. *J Hypertens.* 2008;26:2426–2435.
 67. Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR, Butterfield DA. The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *J Neurochem.* 2001;78:413–416.
 68. Altas M, Meydan S, Aras M, Yilmaz N, Ulutas KT, Okuyan HM, Nacar A. Effects of ceftriaxone on ischemia/reperfusion injury in rat brain. *J Clin Neurosci.* 2013;20:457–461.
 69. Lee SG, Su ZZ, Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, Volsky DJ, Fisher PB. Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem.* 2008;283:13116–13123.

70. Nonose Y, Gewehr PE, Almeida RF, da Silva JS, Bellaver B, Martins LAM, Zimmer ER, Greggio S, Venturin GT, Da Costa JC, et al. Cortical Bilateral Adaptations in Rats Submitted to Focal Cerebral Ischemia: Emphasis on Glial Metabolism. *Mol. Neurobiol.* 2018;55.
71. Liu Y, Mituska S, Hashizume K, Hosaka T, Nukui H. The time course of glucose metabolism in rat cerebral ischemia with middle cerebral artery occlusion-reperfusion model and the effect of MK-801. *Neurol. Res.* 1996;18:505–508.
72. Zimmer ER, Parent MJ, Souza DG, Leuzy A, Lecrux C, Kim H-I, Gauthier S, Pellerin L, Hamel E, Rosa-Neto P. [18F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nat. Neurosci.* [Internet]. 2017;20:393–395. Available from: <https://doi.org/10.1038/nn.4492>
73. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011;14:724–738.
74. Divakaruni AS, Wallace M, Buren C, Martyniuk K, Andreyev AY, Li E, Fields JA, Cordes T, Reynolds IJ, Bloodgood BL, et al. Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. 2017;216:1091–1105.
75. Hoshi A, Nakahara T, Kayama H, Yamamoto T. Ischemic tolerance in chemical preconditioning: possible role of astrocytic glutamine synthetase buffering glutamate-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 2006;84:130–141.
76. Jeitner TM, Battaile K, Cooper AJL. Critical Evaluation of the Changes in Glutamine Synthetase Activity in Models of Cerebral Stroke. *Neurochem. Res.* 2015;40:2544–2556.
77. Ramonet D, Rodríguez MJ, Fredriksson K, Bernal F, Mahy N. In vivo neuroprotective adaptation of the glutamate/glutamine cycle to neuronal death. *Hippocampus* [Internet]. 2004;14:586–594. Available from: <https://doi.org/10.1002/hipo.10188>
78. Kurbat MN, Lelevich V V. Metabolism of amino acids in the brain. *Neurochem. J.* [Internet]. 2009;3:23–28. Available from: <https://doi.org/10.1134/S1819712409010036>
79. Song BC, Joo NS, Aldini G, Yeum KJ. Biological functions of histidine-dipeptides and metabolic syndrome. *Nutr Res Pr.* 2014;8:3–10.
80. Suzuki M, Sasabe J, Miyoshi Y, Kuwasako K, Muto Y, Hamase K, Matsuoka M, Imanishi N, Aiso S. Glycolytic flux controls D-serine synthesis through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2015;112:E2217 LP-E2224. Available from: <http://www.pnas.org/content/112/17/E2217.abstract>
81. Horikawa Y, Naruse S, Hirakawa K, Tanaka C, Nishikawa H, Watari H. In vivo Studies of Energy Metabolism in Experimental Cerebral Ischemia Using Topical Magnetic Resonance. Changes in 31P-Nuclear Magnetic Resonance Spectra Compared with Electroencephalograms and Regional Cerebral Blood Flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* [Internet]. 1985;5:235–240. Available from: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1985.30>
82. Shin TH, Lee DY, Basith S, Manavalan B, Paik MJ, Rybinnik I, Mouradian MM, Ahn JH, Lee G. Metabolome Changes in Cerebral Ischemia. *Cells* [Internet]. 2020;9:1630. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32645907>
83. Frigerio F, Casimir M, Carobbio S, Maechler P. Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1777:965–972.
84. Yudkoff M. Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia.* 1997;21:92–98.
85. Bak LK, Johansen ML, Schousboe A, Waagepetersen HS. Valine but not leucine or isoleucine supports neurotransmitter glutamate synthesis during synaptic activity in cultured cerebellar neurons. *J. Neurosci. Res.* 2012;90:1768–1775.

Figure Legends

- 1. Experimental design and long-term behavior assessment.** (A) Timeline indicating the experimental design, with numeric scale indicating the days pre and post-surgery. (B) Both IS and ICTX groups presented an impaired performance on the cylinder test when compared to the SS group (adjusted GEM; significance, a: not different from SS; b: different from SS; c: different from IS). (C) On García's Neurological Score tests, we observed that the ICTX group improved significantly their neurologic score (adjusted GEM; significance, a: not different from SS; b: different from SS; c: different from IS). (D) 42 days post-FPI, only ICTX animals were able to reach a symmetry score above 80% (3 animals of 11, 27.27%). (E) At the same time point, the ICTX group had better performances on the neurologic score than the IS group: while 7 ICTX animals (total of 12, 58.33%) presented a score above 80% (≥ 12.5 points), only 1 IS animal showed an equivalent performance (total of 12, 8.33%). (F) Representation of the NORT experimental design and (G) index of the exploration time of both objects of each phase of the experiment. Unpaired *t* test, data expressed as mean \pm SEM.
- 2. CTXpre primary effects on infarct volume 2 days post-FPI.** (A) CTXpre decreased infarct volume in almost 25% in comparison to the non-treated group (Unpaired *t* test). (B) Representative TTC-stained FPI-injured brains 2 days post-FPI. (C) Scheme representing cerebral areas affected by FPI and the cortical area analyzed in this study for biochemical alterations. All data expressed as mean \pm SEM.
- 3. Both FPI and CTXpre increase glutamate uptake, but appear to have no effect on the glutamate release machinery 2 days post-surgery.** (A) CTXpre upregulated the mRNA expression of GLT-1, but did not prevent its downregulation by FPI. (B) CTXpre alone increased GLT-1 immunocontent in the SCTX group, while FPI injury had the opposite effect in the ischemic groups, indicating that CTXpre could not prevent this effect in the ICTX group. (C) FPI injury increased [H^3]-Glutamate uptake activity in cortical slices when compared to control SS (absence of unlabeled glutamate). Nevertheless, the ICTX group presented a higher uptake activity than the IS group. (D) FPI injury increased glutamate levels in the CSF when compared to the control group. CTXpre prevented this increase in the ICTX group, showing lower levels of glutamate in the CSF when compared to the IS group and similar levels to control SS. The other parameters were evaluated in synaptosomal preparations from the cortical cluster: (E) Basal and (F) K^+ -stimulated release of [H^3]-Glutamate from synaptosomes were similar amongst all groups. All data analyzed by 2-way ANOVA and expressed as mean \pm SEM.
- 4. FPI increased substrates oxidation to CO_2 , while CTXpre reduced hypermetabolism 2 days post-FPI.** (A) Both CTXpre and FPI injury increased glucose oxidation in the IS and SCTX groups when compared to the SS group. However, in the ICTX group, CTXpre prevented this increase in comparison to the IS group. (B) FPI injury increased glutamate oxidation to $^{14}CO_2$ in the IS and ICTX groups when compared to the control. (C) FPI increased lactate oxidation, which was completely prevented by CTXpre in the ICTX group. All data analyzed by 2-way ANOVA and expressed as mean \pm SEM.

- 5. FPI and CTXpre effects on metabolic pathways involving glutamate handling 2 days post-FPI. (A)** FPI decreased GS immunocontent in the IS group, while CTXpre prevented this decrease, maintaining protein levels similar to control values. **(B)** FPI decreased GS activity, which was prevented by CTXpre. **(C)** FPI decreased glutamine levels in the CSF in comparison to the control SS, while CTXpre was able to prevent this effect, suggesting that glutamine availability may be a part of CTX neuroprotective effects. All data analyzed by 2-way ANOVA and expressed as mean \pm SEM.

- 6. Both FPI and CTXpre altered amino acid levels in the CSF 2 days after injury. (A)** Serine/Histidine concentration were increased in all experimental groups compared to control. **(B)** Aspartate levels were increased in the ICTX group in comparison to the IS group ($^{##} P<0.01$) and to the control. **(C)** CTXpre decreased Valine levels in CSF and the ICTX group presented lower values when compared to the IS group ($^{##} P<0.01$). All data analyzed by 2-way ANOVA and expressed as mean \pm SEM.

- 7. Summary of CTXpre and FPI injury alterations in cortical neurochemistry 2 days post-FPI. (A)** All data were normalized to control values (SS group; black color) in a ‘percent of control’ scale. Red color represents higher values (increase), as green color stands for lower ones (decrease). We can observe that CTXpre alone increased GLT-1 mRNA expression and immunocontent. On the other hand, FPI injury resulted in the following effects: (i) decreased in GLT-1 expression; (ii) increased in glutamate uptake; (iii) increased glutamate uptake, but also (iv) could not remove all glutamate from the extracellular space; (v) hypermetabolized glutamate; (vi) decreased GS immunocontent and activity, thereby (vii) decreased glutamine availability in the CSF. These alterations suggest that the cerebral area in the ischemic core periphery had its metabolism impaired through astrocyte-neuron interactions such as the glutamate-glutamine cycle. In addition, the tissue faces a decrease in substrate availability, leading to hypermetabolism in an attempt to compensate. In the ischemic pretreated group (ICTX), we can observe that main neuroprotective effects might be a result of: (i) increased glutamate uptake; (ii) lower glutamate levels in the CSF; (iii) preservation of GS activity and immunocontent; (v) increased glutamine availability in the CSF; (vi) stimulation of glutamate oxidation and, consequently, (vii) releasing aspartate in the CSF in the Glu-Asp exchange in the inner mitochondria membrane, all in favor of glutamate oxidation in neuronal cells. CTXpre appeared to have an effect in preserving essential astrocyte-neuron metabolic exchanges, maintaining metabolic efficient and, therefore, decreasing the impact of the energetic failure post-FPI injury. **(B)** Representative model of CTXpre influence on glutamate metabolic ffate after FPI. CTXpre influence on GLT-1 activity and expression was effective to increase glutamate uptake by astrocytes. With GS activity at control levels, the glutamate-glutamine cycle was maintained. Due to the shortage of glucose supply, neurons used glutamate as an anaplerotic substrate, and also increased the oxidation of the branched-chain amino acid valine. Glutamate entrance in the TCA cycle is possible by the activity of AAT, which increases the synthesis of Aspartate and favors glutamate oxidation by stimulating the malate-aspartate shuttle.

Figure S1. Uptake of L-[³H]-Glutamate in synaptosomal preparations from the cortical region of interest. * $P < 0.05$ (SS: 100.0 ± 15.38 ; ICTX: 128.9 ± 22.18 ; $P = 0.0258$; FPI factor: $P = 0.0003$, $F_{(1, 23)} = 18.42$; 2-way ANOVA, $N = 6-7$).

Figure S2. Total exploration time in NORT (42 days post-FPI). There was no statistical significance between experimental groups in any phase of the test (2-way ANOVA).

Figure S3. Concentration in the CSF for the amino acids (A) Alanine and (B) Tryptophan 2 days post-FPI. FPI injury is the source of variation for Alanine levels, but no statistical differences were confirmed by multiple comparisons (FPI factor: $P = 0.0060$, $F_{(1, 30)} = 8.748$; 2-way ANOVA, $N = 7-8$ per group), but the groups were not statistically different when compared directly. FPI increased the concentration of the amino acid Tryptophan in the IS group (SS: 1.325 ± 0.16 ; IS: 2.420 ± 0.23 , $P = 0.0087$; FPI factor: $P = 0.0012$, $F_{(1, 32)} = 12.72$; 2-way ANOVA; $N = 7-10$ per group), which may suggest a decrease in its use for neurotransmitter synthesis shortly after ischemia. All data analyzed by 2-way ANOVA and expressed as mean \pm S.E.M.

Table S1. Detailed explanation of García's Neurologic Score attribution of points on animal's performance. Adapted from García et al., 1995.

Table S2. Means and S.E.M. values for all experimental groups during a 6 weeks analysis in the cylinder test.

Table S3. Means and S.E.M. values for all experimental groups during a 6 weeks analysis in the García's Neurologic Score.

Figure 1.

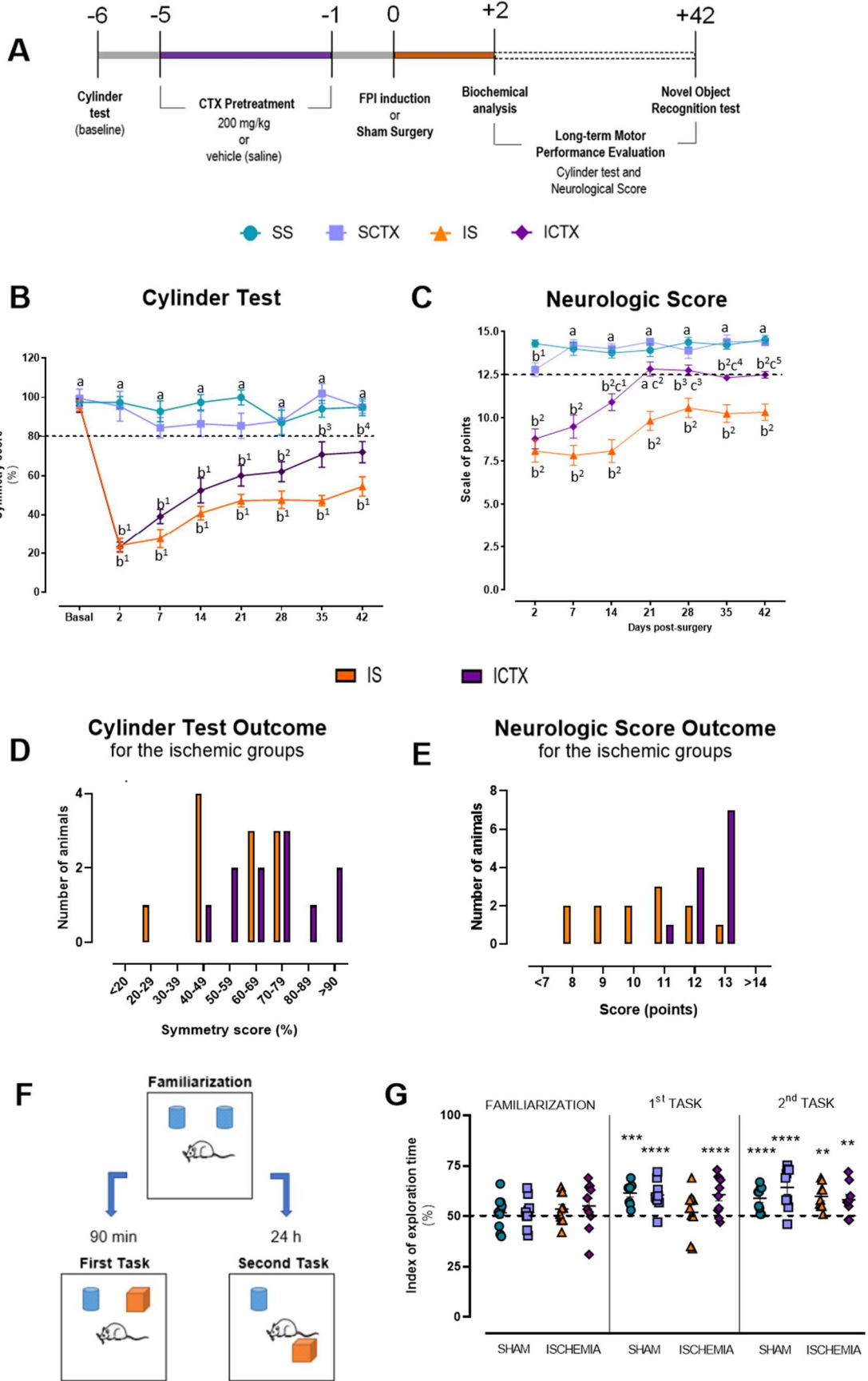


Figure 2.

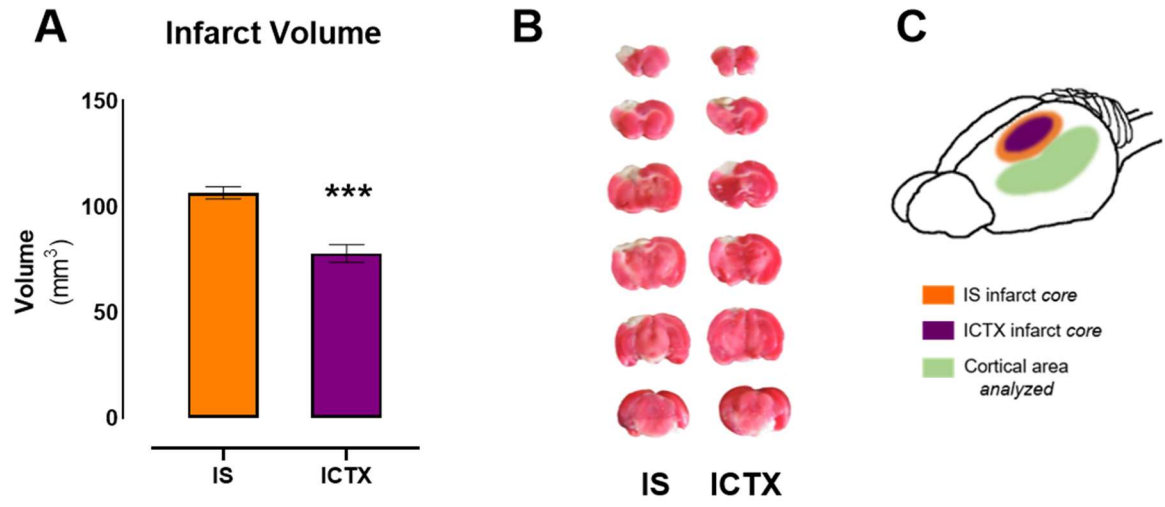


Figure 3.

□ Saline ■ CTX

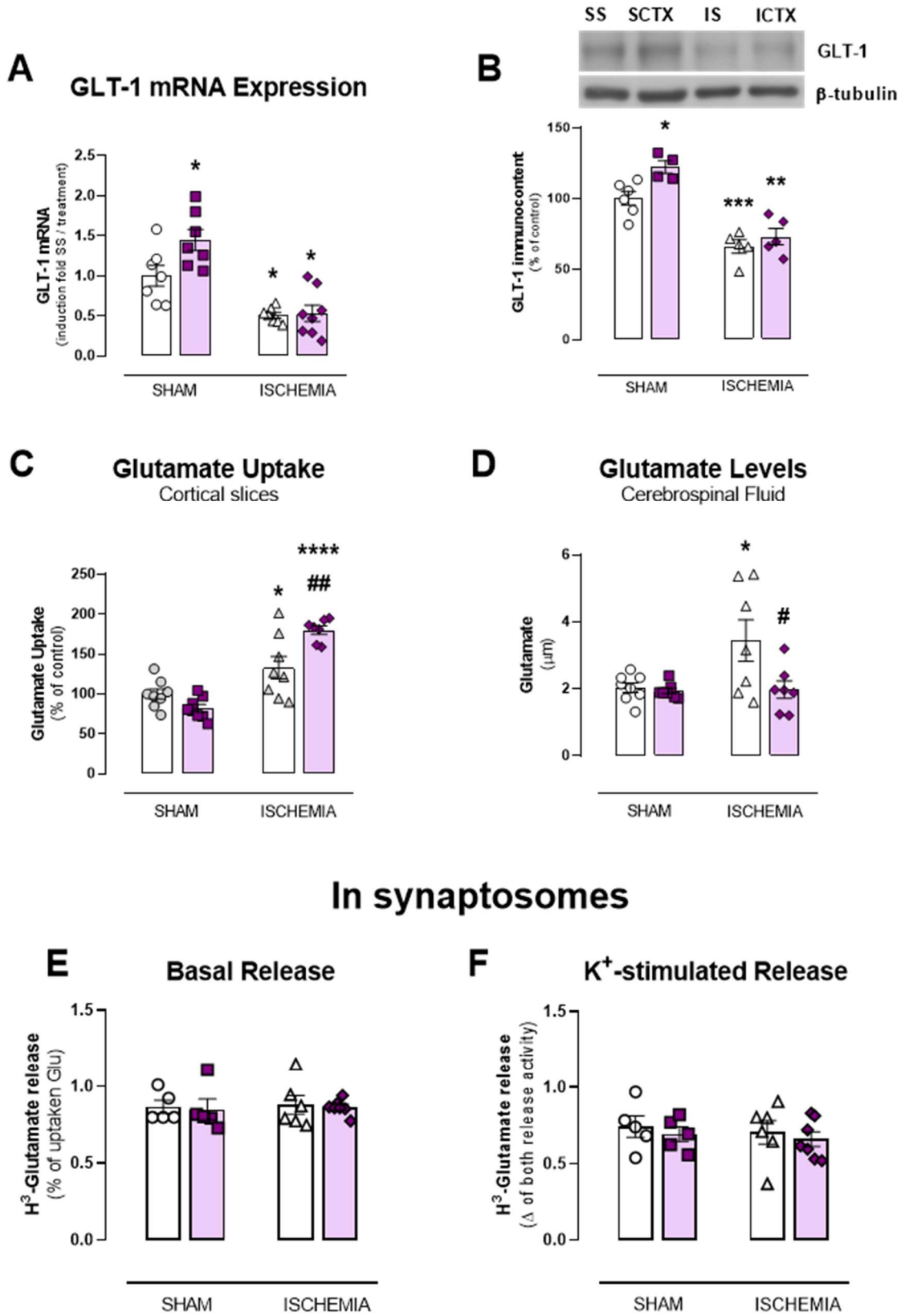


Figure 4.

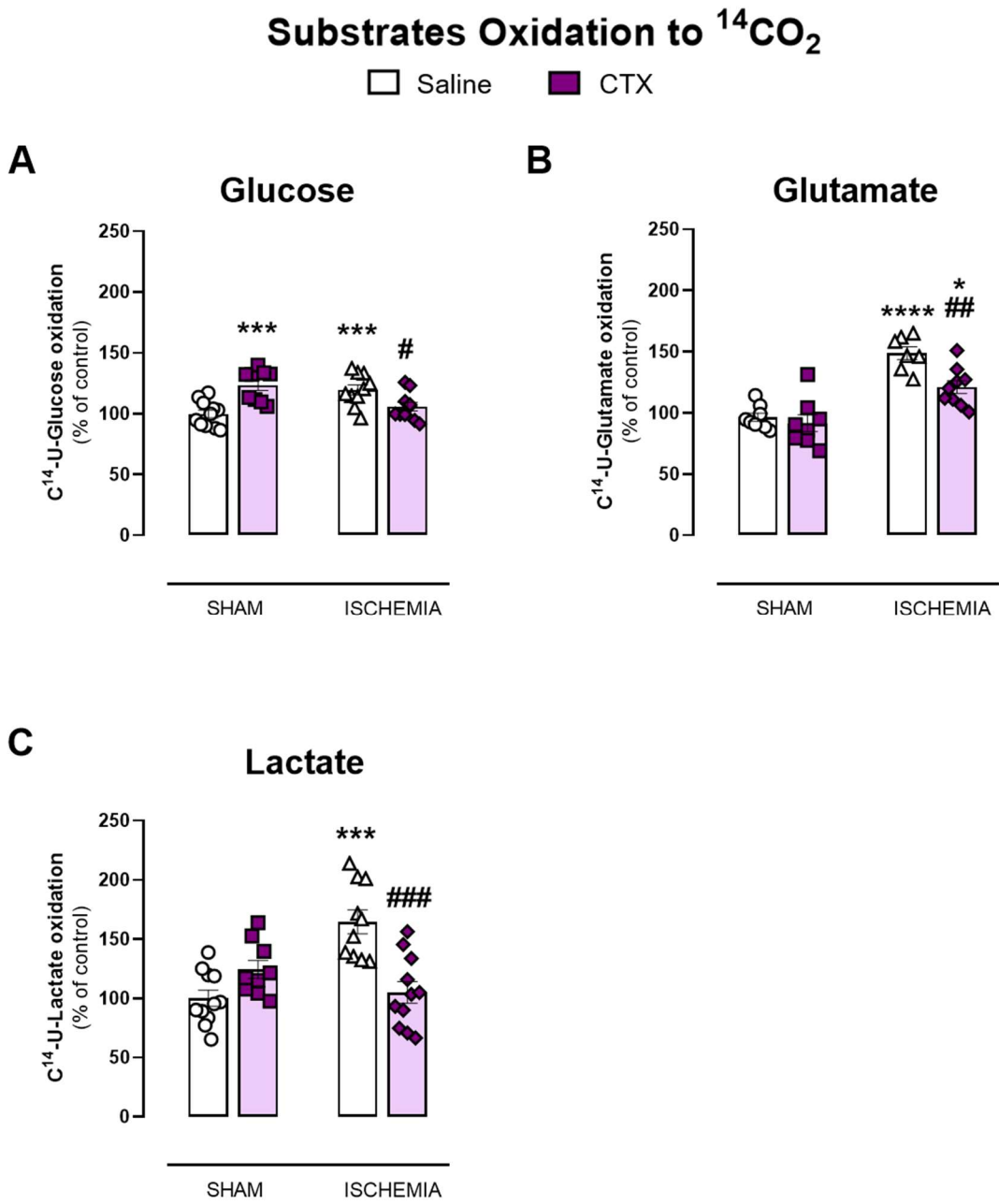


Figure 5.

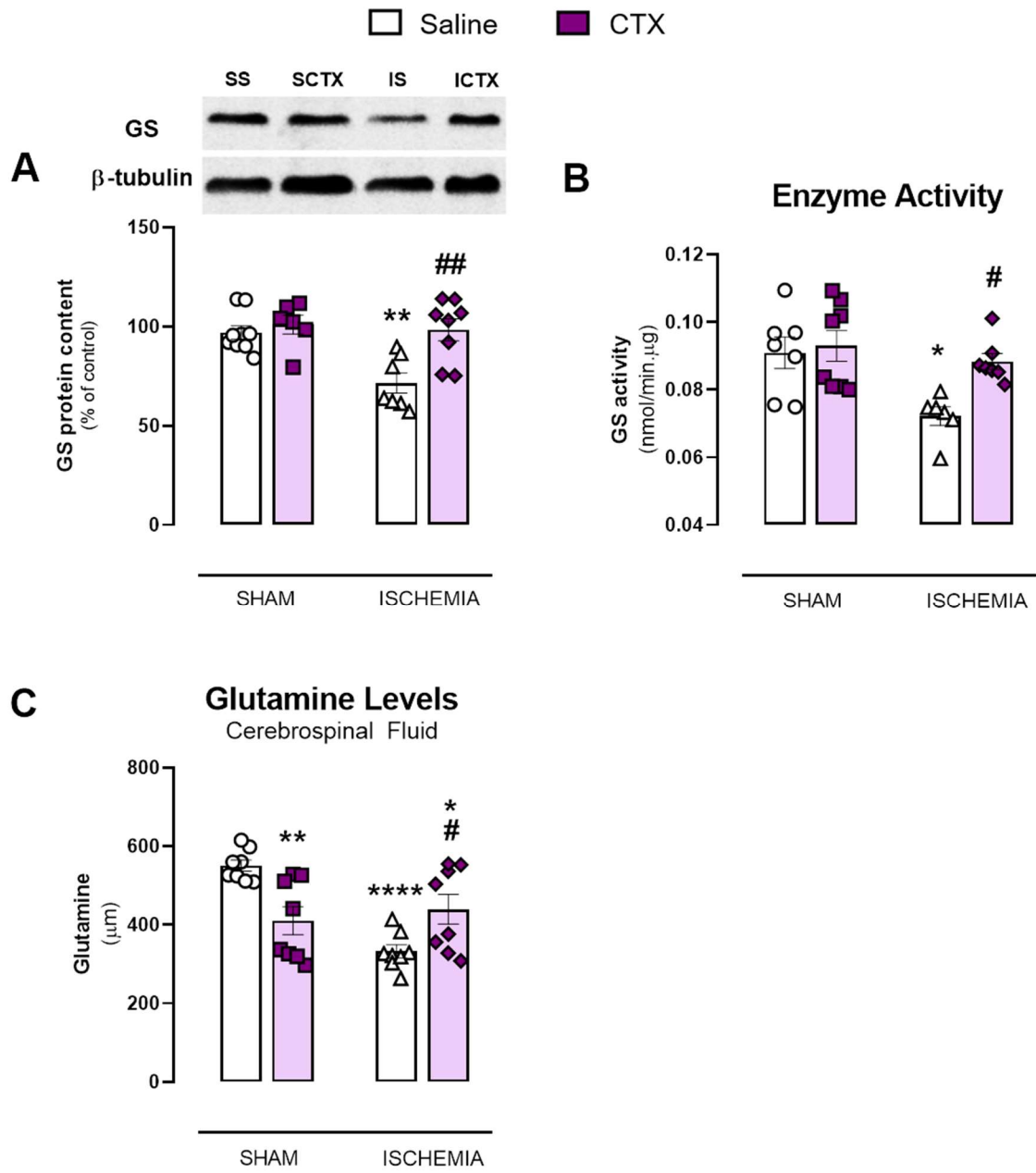


Figure 6.

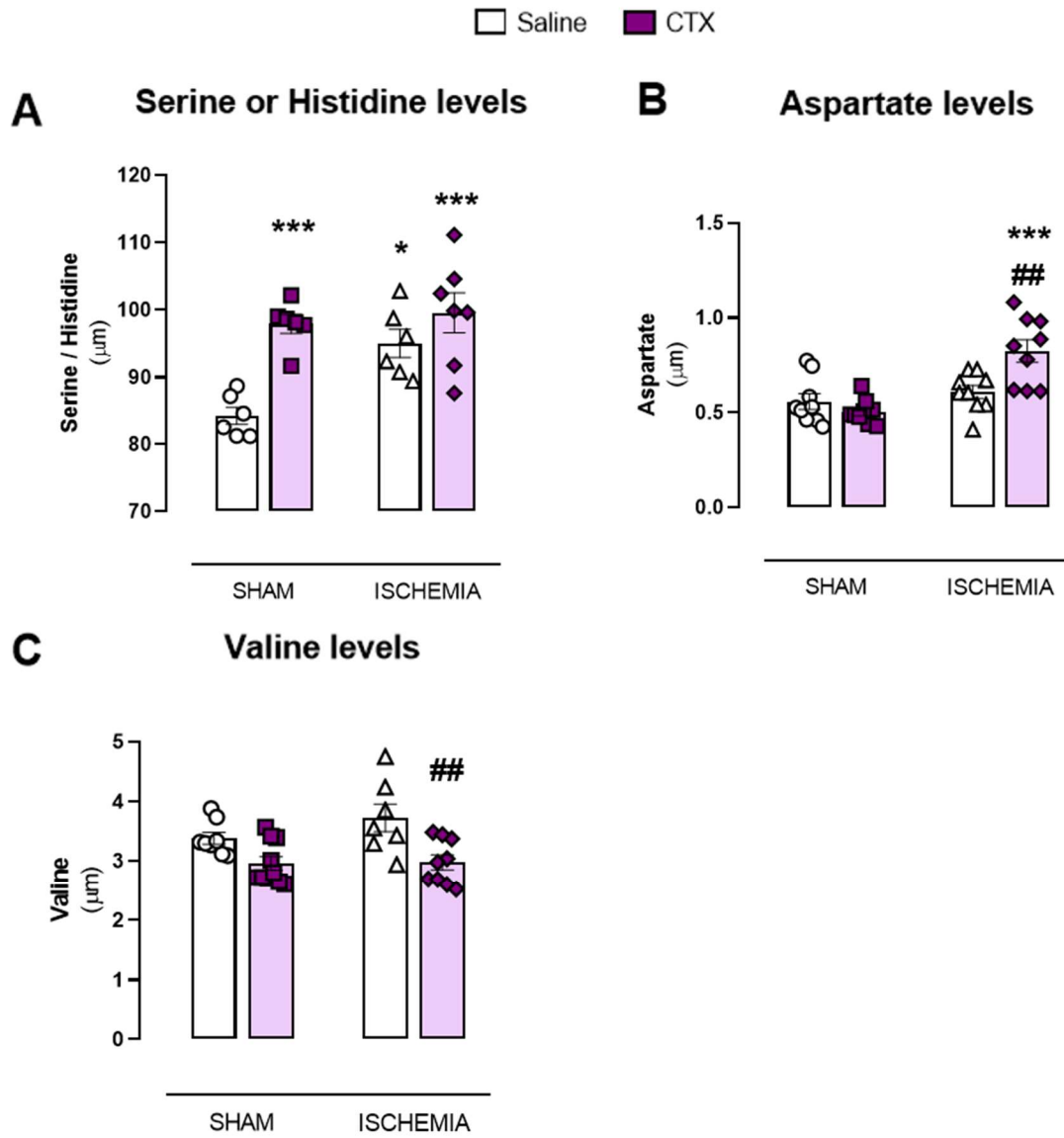


Figure 7.

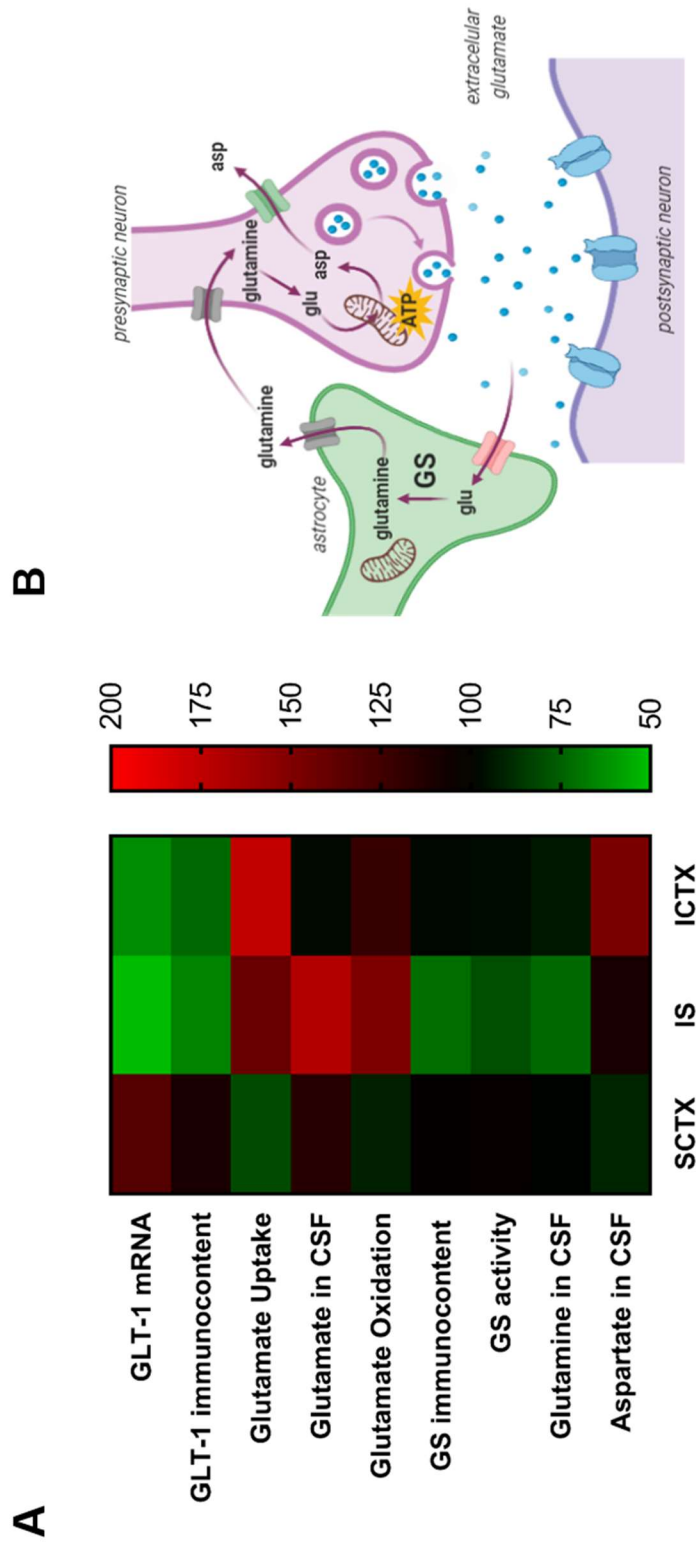


Figure S1.

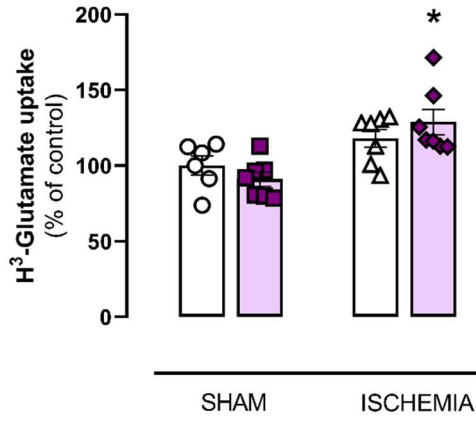


Figure S2.

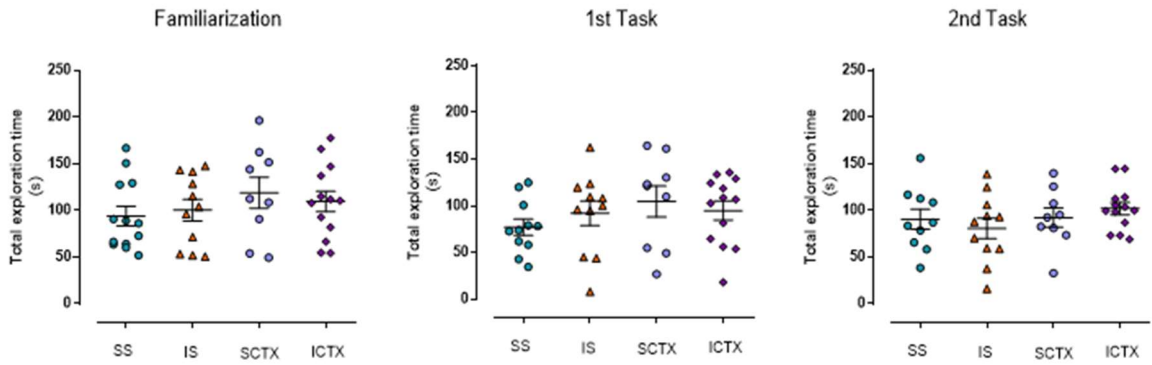


Figure S3.

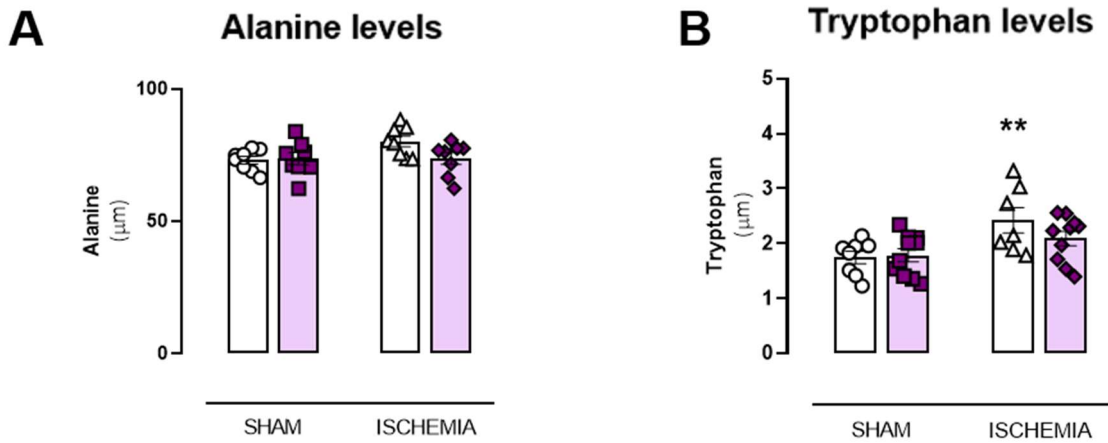


Table S1.

TEST	SCORE			
	0	1 point	2 points	3 points
Symmetry in the Movement of Four limbs	Forelimb on the contralateral side did not move at all	Limbs on the contralateral side showed minimal movement	Limbs on the contralateral side extended less or more slowly than those on the ipsilateral side	All four limbs extended symmetrically
Forepaw Outstretching	Contralateral forelimb did not move	Contralateral forelimb moved minimally	Contralateral side outstretched less than the ipsilateral and forepaw walking was impaired	Both forelimbs were outstretched and the rat walked symmetrically on forepaws
Climbing	-	The rat failed to climb or tended to circle instead of climbing	Contralateral side was impaired while climbing or did not grip as hard as the ipsilateral side	The rat climbed easily and gripped tightly to the wire
Body Proprioception	-	The rat did not respond to the stimulus placed on the contralateral side.	The rat reacted slowly to stimulus on left side	The rat reacted by turning head and was equally startled by the stimulus on both sides
Response to Vibrissae Touch	-	The rat did not respond to stimulus on the contralateral side	The rat reacted slowly to stimulus on the contralateral side	The rat reacted by turning head or was equally startled by the stimulus on both sides

Table S2.

Time point	SS	SCTX	IS	ICTX
Basal	97.5 (1.61) a	99.5 (4.55) a	95.9 (2.64) a	95.8 (3.27) a
2 days	97.5 (2.80) a	95.5 (7.23) a	24.1 (3.45) b ¹	23.3 (2.38) b ¹
7 days	92.9 (5.05) a	84.5 (4.92) a	27.7 (4.56) b ¹	39.2 (3.48) b ¹
14 days	97.5 (3.80) a	86.5 (6.17) a	40.9 (3.27) b ¹	52.5 (6.08) b ¹
21 days	100.0 (3.68) a	85.5 (6.10) a	47.3 (3.04) b ¹	60.0 (5.03) b ¹
28 days	87.1 (6.19) a	88.0 (6.45) a	47.7 (4.23) b ¹	62.1 (4.88) b ²
35 days	94.2 (4.08) a	102.0 (4.75) a	47.3 (2.52) b ¹	70.8 (6.23) b ³ , c
42 days	95.0 (4.08) a	95.0 (2.92) a	54.5 (4.74) b ¹	72.1 (5.19) b ⁴

All data expressed as mean (S.E.M.).

P value adjustment done with Tukey *posthoc* test for comparing a family of 4 estimates.

Letter 'a' means statistical similarity with SS, while different letters represent statistical significance between groups.

Significance in comparison to SS, b¹: *P*<0.0001; b²: *P*=0.0082; b³: *P*=0.0094; b⁴: *P*=0.0029.

Significance in comparison to IS, c: *P*=0.0026.

Table S3.

Time point	SS	SCTX	IS	ICTX
2 days	14.31 (0.200) a	12.80 (0.369) b ¹	8.08 (0.606) b ²	8.79 (0.551) b ²
7 days	14.00 (0.361) a	14.20 (0.310) a	7.83 (0.551) b ²	9.50 (0.640) b ²
14 days	13.77 (0.291) a	14.00 (0.283) a	8.08 (0.629) b ²	10.92 (463) b ² , c ¹
21 days	13.92 (0.352) a	14.40 (0.210) a	9.83 (0.525) b ²	12.83 (0.388) a, c ²
28 days	14.38 (0.278) a	13.90 (0.435) a	10.58 (0.533) b ²	12.75 (0.292) b ³ , c ³
35 days	14.23 (0.247) a	14.40 (0.380) a	10.25 (0.488) b ²	12.33 (0.180) b ² , c ⁴
42 days	14.54 (0.234) a	14.40 (0.210) a	10.33 (0.446) b ²	12.50 (0.186) b ² , c ⁵

All data expressed as mean (S.E.M.).

P value adjustment done with Tukey *posthoc* test for comparing a family of 4 estimates.

Letter 'a' means statistical similarity with SS, while different letters represent statistical significance between groups.

Significance in comparison to SS, b¹: *P*=0.0019; b²: *P*<0.0001; b³: *P*=0.0003.

Significance in comparison to IS, c¹: *P*=0.0016; c²: *P*<0.0001; c³: *P*=0.0021; c⁴: *P*=0.0004; c⁵: *P*<0.0001.

Principais contribuições do Capítulo 2

Dentre os resultados obtidos neste capítulo, destacam-se:

- 1.** O CTXpre apresentou efeitos neuroprotetores frente ao modelo de FPI, com diminuição do volume de infarto e melhora neurocomportamental do grupo ICTX;
- 2.** A lesão isquêmica parece ter uma influência hierarquicamente superior ao CTXpre sobre a expressão de GLT-1, o que manteve sua regulação negativa 2 dias pós-FPI;
- 3.** A FPI é capaz de aumentar a captação de glutamato, enquanto que o CTXpre teve um efeito sinérgico, tornando a remoção desse neurotransmissor do meio extracelular mais eficiente; é possível que a preservação da atividade da GS esteja por trás dessa resposta;
- 4.** A análise da oxidação de substratos mostra que o CTXpre foi capaz de prevenir a elevada taxa oxidativa para glicose e lactato, mas não para o glutamato, sugerindo que esse aminoácido seria um substrato-chave para a otimização energética pós-FPI; tal achado parece ser reforçado pelo perfil de aminoácidos no grupo ICTX;
- 5.** O CTXpre induziu uma reprogramação da resposta tecidual à lesão de FPI, permitindo a preservação de vias metabólicas relacionadas com o acoplamento astrócito-neurônio.

PARTE III

4. DISCUSSÃO

O AVE é uma das principais causas de morte e deficiência adquirida em adultos atualmente. No Brasil, são registradas cerca de 68 mil mortes por AVE anualmente. A doença representa a primeira causa de morte e incapacidade no país, gerando um grande impacto econômico e social (Ministério Da Saúde 2012). Mesmo com o desenvolvimento de políticas de prevenção e controle dos fatores de risco, o índice de mortalidade dos pacientes tende a decair mais rapidamente do que a incidência de IC (Koton et al. 2014; Carmichael 2015), de modo que os sobreviventes comumente sofrem de deficiências funcionais crônicas, aumentando a necessidade de assistência médica. Dessa forma, além da compreensão dos mecanismos patofisiológicos, devemos buscar o entendimento dos processos que levam à reparação e à recuperação cerebrais, visando a reabilitação desses pacientes.

Diversos processos neuroquímicos são desencadeados no cérebro após o início do evento isquêmico, causando morte celular no centro do infarto (*core* isquêmico). Em torno dessa área, reside a denominada “zona de penumbra”, tecido que apresenta uma hipoperfusão, mas que mantém o metabolismo energético parcialmente preservado. A zona de penumbra está sujeita a uma onda de processos deletérios propagados do *core*, incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo e resposta inflamatória. Tais processos levam à expansão do núcleo isquêmico e ao subsequente agravamento do desfecho clínico. Dessa forma, a região da penumbra pode passar por alterações celulares e moleculares para adaptar-se, podendo apresentar comprometimento bioenergético intermitente. Do ponto de vista terapêutico, a penumbra é considerada um alvo para tratamentos neuroprotetores e neuro-reparadores por apresentar plasticidade cerebral (Ramos-Cabrer et al. 2011).

Vários eventos moleculares são alvos potenciais para estratégias neuroprotetoras, incluindo inflamação, apoptose neuronal, estresse oxidativo, excitotoxicidade e influxo de cálcio nas células. O dano provocado por excitotoxicidade é o mecanismo mais investigado em modelos experimentais de IC (O’Collins et al. 2006). No SNC, é comum relacionar a homeostase do glutamato com sua função como neurotransmissor e compartimentalizar seu metabolismo ao ciclo glutamato-glutamina. Entretanto, o glutamato é também um aminoácido, sendo essencial para biossíntese, homeostase redox e controle hormonal do metabolismo nos tecidos periféricos (Newsholme et al. 2003). Além disso, o glutamato está intimamente relacionado com o ciclo do TCA, e seu gerenciamento metabólico em eventos

excitotóxicos ou de estresse metabólico ainda é pouco considerado (Divakaruni et al. 2017). Considerando que a insuficiência bioenergética constitui a base fisiológica da IC, a disponibilidade de substratos, bem como sua utilização, pode sofrer adaptações e representar um alvo terapêutico promissor para manipulação farmacológica.

De maneira sucinta, nesta tese apresentamos: (i) processos metabólicos decorrentes de dano isquêmico focal permanente na região da penumbra, relacionando com perfil de citocinas e fatores tróficos relevantes e com reatividade astrocitária; (ii) a contribuição de adaptações metabólicas que envolvem o catabolismo do glutamato após a indução de lesão isquêmica focal permanente para a interconectividade entre hemisférios; (iii) o papel do glutamato como substrato energético preferencial na reprogramação metabólica pelo pré-tratamento com CTX pós-FPI; (iv) a reprogramação metabólica decorrente do pré-tratamento com CTX no desfecho comportamental. Por fim, demonstramos mecanismos intrínsecos de adaptação metabólica, bem como uma maneira de reprogramar essa resposta, otimizando o metabolismo durante a IC que culminaram na melhoria do desempenho comportamental a longo prazo.

4.1. Caracterização das alterações neuroquímicas e comportamentais no modelo experimental de FPI

Modelos experimentais são ferramentas indispensáveis no estudo da patofisiologia da IC, uma vez que são altamente reprodutíveis e controláveis, permitindo a manipulação e o acesso direto ao tecido cerebral de interesse. Na prática clínica, a IC é majoritariamente permanente (Yu et al. 2015), o que reduz a janela terapêutica para a recuperação da zona de penumbra e piora o desfecho clínico do paciente. As opções de tratamento são limitadas, e apenas uma pequena porcentagem dos pacientes é tratada com agente trombolítico ou com abordagem endovascular (Krzyzanowska et al., 2016), fazendo com que o uso de modelos de oclusão permanente se assemelhe mais à patologia observada em humanos.

No Capítulo 1, caracterizamos as modulações provocadas pela indução de FPI (realizada por termocoagulação) no córtex de ratos Wistar adultos, incluindo parâmetros inflamatórios, astrocitários e metabólicos. Encontramos alterações neuroquímicas que corroboram com a patofisiologia da IC observada em outros modelos experimentais, tais como: (i) redução da expressão do transportador de

glutamato GLT-1 na região da penumbra (Rao, Bowen, and Dempsey 2001; Han et al. 2008); (ii) reatividade astrocitária, com aumento do número de processos na região do peri-infarto (Li et al. 2008); (iii) concentrações aumentadas de TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β) (Minami et al. 1992; Buttini, Sauter, and Boddeke 1994; Barone et al. 1997; Liu et al. 1994); e (iv) modulação da expressão proteica de MCTs (Rosafio et al. 2016). O não restabelecimento do fluxo sanguíneo pode ter influenciado a persistência de alguns desses efeitos, incluindo: (i) a regulação negativa sobre GLT-1; (ii) o hipometabolismo in vivo de [^{18}F]FDG na região da penumbra; (iii) aumento da captação de glutamato; e (iv) o hipermetabolismo ex vivo de L-[^{14}C (U)]-Glutamato e L-[^{14}C (U)]-Lactato (sugestivo de grande necessidade metabólica), que foram observados 9 dias após a indução de FPI.

No Capítulo 2, realizamos uma análise comportamental ao longo de seis semanas, permitindo a caracterização da performance sensório-motora dos animais pós-FPI. Pudemos observar que: (i) há uma curva de recuperação espontânea para o grupo IS (de 2 a 4 semanas pós-FPI, sem nenhum treinamento de reabilitação), em conformidade com o estudo de Takatsuru e colaboradores (Takatsuru, Nabekura, and Koibuchi 2014); e (ii) o grupo IS não foi capaz de reconhecer o objeto familiar 42 dias pós-FPI após um curto período de retenção (90 min), reforçando que a lesão tem efeitos deletérios a longo prazo. Esses resultados demonstram a importância da avaliação a longo prazo na performance sensório-motora e cognitiva dos animais para a determinação da gravidade final da lesão, bem como para visualização de possíveis efeitos de intervenções terapêuticas, como discutiremos abaixo.

Por fim, todos os modelos experimentais apresentam vantagens e limitações que devem ser consideradas tanto para a escolha do método quanto para a interpretação final dos dados. Para a realização da FPI por termocoagulação, realizamos uma craniotomia para ter acesso direto aos vasos, o que constitui uma cirurgia invasiva e que requer um elevado grau de competência cirúrgica para evitar dano direto por perfuração. Por outro lado, esse procedimento possibilita uma confirmação visual da oclusão, corroborando para a alta reprodutibilidade da lesão (Fluri, Schuhmann, and Kleinschnitz 2015). Além disso, modelos envolvendo craniotomia são conhecidos por mimetizarem melhor a zona de penumbra (Sommer 2017), tornando o modelo de FPI útil para o estudo das alterações que acontecem nessa região.

4.2. Determinação da região afetada no modelo de FPI

A expansão do núcleo do infarto às custas da zona de penumbra é a dinâmica “natural” após a oclusão permanente da circulação sanguínea em uma determinada região cerebral. No entanto, observamos algum retorno de atividade metabólica *ex vivo* pela coloração de TTC e *in vivo* por determinação do metabolismo de [¹⁸F]FDG em microPET 9 dias após a indução de FPI (Capítulo 1). A coloração de TTC é utilizada para diferenciar tecido metabolicamente ativo de inativo, sendo considerada um marcador confiável e acessível para mensurar volume de infarto. Originalmente incolor, o cloridrato de TTC é quimicamente reduzido a 1,3,5-trifenil formazan, um composto de cor vermelha, na presença de desidrogenases mitocondriais (Altman 1976; Kramer et al. 2010). Realizamos essa medida 2 e 9 dias pós-FPI. Aos 2 dias, podemos observar a área atingida para determinação do núcleo isquêmico. Já aos 9 dias após a lesão, a área infartada recuperou espontaneamente uma parte significativa de sua atividade metabólica (aproximadamente 73%), podendo indicar angiogênese em curso ou a migração de células para o local, incluindo progenitores neurais e/ou sua proliferação (Carmichael 2015). Nossos resultados também evidenciaram que, nesse período, a recuperação metabólica da zona infartada não refletiu em melhora na performance motora dos animais isquêmicos (vide Capítulos 1 e 2), reforçando a ideia de que a rede neuronal original foi comprometida pela oclusão permanente e que a medida por coloração de TTC nesse tempo experimental pode ser mais indicativo de outro tipo de atividade celular no local.

Quanto ao resultado observado no MicroPET, podemos hipotetizar que o aumento do metabolismo de [¹⁸F]FDG aos 9 dias (em comparação com a medida obtida aos 2 dias pós-FPI) pode ser devido à neuroinflamação presente na região. Tal hipótese baseia-se não só na concentração elevada de TNF- α nesse tempo experimental, como também na observação feita por Fukumoto e colaboradores (2011). Os autores empregaram o modelo de MCAO por trombose induzida fotoquimicamente em ratos e realizaram uma avaliação seriada em PET (*baseline* e 1, 3, 7 e 14 dias após indução de IC) com a utilização de [¹⁸F]FDG para o metabolismo da glicose e [¹¹C]PK11195 para neuroinflamação. A captação de [¹⁸F]FDG nas áreas peri-isquêmicas foi comparável às regiões cerebrais normais nos dias 1 e 3 e aumentou significativamente nos dias 7 e 14. Esse resultado coincidiu com o aumento da captação de [¹¹C]PK11195 nos dias 3 a 14, o que sugere que o aumento tardio da

captação de [¹⁸F]FDG nessa região pode ser atribuído à inflamação. Além disso, no dia 7 pós-MCAO, houve uma sobreposição significativa entre o aumento da captação de [¹⁸F]FDG e [¹¹C](R)PK11195 na autorradiografia, bem como aumento da coloração imunohistoquímica de Iba1. Juntos, esses achados implicam ativação microglial nesse período. Resultados semelhantes também foram relatados por Rojas et al. (Rojas et al. 2007), embora a neuroinflamação tenha sido mais pronunciada no núcleo isquêmico em comparação com a penumbra no dia 4 após a indução de MCAO transitória. A diferença nos modelos animais pode ser responsável pelas discrepâncias entre esses dois estudos. A análise da resposta inflamatória microglial não foi o foco desta tese (*vide* Hansel et al. 2015), porém avaliamos reatividade astrocitária, bem como sua participação no modelo de FPI (Nonose et al. 2018) (discussão logo abaixo).

No Capítulo 2, comparamos os volumes de infarto entre animais pré-tratados com CTX (ICTX) com animais que receberam apenas veículo (salina; IS) 2 dias pós-FPI. Observamos que o grupo ICTX apresentou um volume de infarto aproximadamente 25% menor face à lesão induzida por FPI, sugerindo uma ação neuroprotetora para este fármaco. Por se tratar de uma lesão permanente, é possível que o pré-tratamento com CTX tenha prevenido a expansão do infarto, considerando que um dos principais mecanismos envolvidos na propagação da lesão isquêmica é a excitotoxicidade glutamatérgica (Siesjö et al. 1995).

4.3. Reatividade astrocitária no modelo de FPI

As características morfológicas e funcionais dos astrócitos são alteradas sob circunstâncias patológicas, tornando-os reativos. Em IC, a reatividade astrocitária é conhecida por formar uma cicatriz glial, separando o resto do tecido cerebral do foco na lesão e aumentando a expressão de citocinas, quimiocinas e regulando a resposta imune (Li et al. 2008; Cekanaviciute and Buckwalter 2016). Por formar essa barreira física, estudos indicam que os astrócitos limitam o dano cerebral, reduzindo a neuroinflamação e mantendo a homeostase do SNC na fase aguda da IC (Li et al. 2008).

A característica mais marcante da reatividade astrocitária é a hipertrofia de seus processos e o aumento de expressão de GFAP, como observamos no Capítulo 1 (Nonose et al. 2018). Nossos resultados mostram que a alteração mais marcante foi

o aumento do número de processos centrais primários nos astrócitos do hemisfério ipsilateral do grupo Isquemia em ambos os tempos analisados, atribuindo uma simetria mais radial à astroglia e indicando reatividade astrocitária.

Ao se tornarem reativos, os astrócitos também produzem e liberam mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-1 β , estando diretamente relacionados à inflamação na IC (Muir et al. 2007). Entretanto, é possível que a reatividade astrocitária também possa influenciar outros parâmetros, *e.g.*, conversão de glutamato em glutamina. O aumento da expressão de GFAP já foi correlacionado com uma diminuição na atividade da GS (Weir and Thomas 1984), acarretando na diminuição tanto nos níveis de glutamina quanto nas taxas de conversão glutamato-glutamina (Lieth et al. 1998). No capítulo 2, observamos que a FPI levou a uma diminuição de imunoconteúdo de GS, bem como de sua atividade enzimática, no grupo IS. Apesar dos resultados serem sugestivos de danos diretos à enzima (*i.e.*, estresse oxidativo), não se pode descartar a hipótese de que a reatividade astrocitária tenha alguma influência nesse parâmetro.

É possível que a reatividade astrocitária também tenha influência sobre outros parâmetros, como demonstram estudos envolvendo vimentina e GFAP, ambos filamentos intermediários de citoesqueleto astrocitário. Estudos que utilizaram animais nocaute para GFAP exibiram uma diminuição significativa no fluxo sanguíneo cortical cerebral acompanhado de um aumento relativo no volume de infarto quando comparados com animais *wild type* após MCAO (Nawashiro et al. 2000), indicando que a ausência de GFAP acarreta em uma maior suscetibilidade à IC. Essa vulnerabilidade poderia ser o resultado da redução dos transportadores de glutamato astrocitário (GLAST e GLT-1) e neuronal (EAAC1) observada nesses animais nocaute (Hughes et al. 2004). Sabe-se que a ausência de GFAP prejudica significativamente o deslocamento de GLT-1 para a superfície celular de astrócitos em cultura, o que pode ter consequências importantes na fase aguda da IC, na qual os astrócitos são responsáveis pela captação de glutamato para mitigar efeitos excitotóxicos (Mitani and Tanaka 2003). De maneira complementar, trabalhos que utilizaram um modelo de duplo nocaute GFAP/Vimentina indicaram que sua presença é essencial para que a reatividade astrocitária possa exercer funções neuroprotetoras após IC. Sua deleção acarreta na diminuição da captação de glutamato, maior suscetibilidade ao estresse oxidativo e aumento do volume de infarto, provavelmente por prejudicar a formação da cicatriz glial na fase aguda da IC. Nossos dados parecem corroborar com esses

estudos que ilustraram a importância da GFAP em parâmetros astrocitários de importância para a contenção do infarto.

Considerando os relatos supramencionados, como perspectiva para o Capítulo 2 desta tese, poderíamos sugerir a avaliação da reatividade astrocitária após o CTXpre e indução de FPI, uma vez que o papel da reatividade astrocitária ainda não é bem compreendido em protocolos de PC. Se a hipótese for válida, e tendo como base os resultados comportamentais obtidos no Capítulo 2, podemos hipotetizar que o CTXpre potencializaria as ações neuroprotetoras nos astrócitos reativos, possibilitando uma rápida contenção da expansão do infarto e, conseqüentemente, acelerando a recuperação funcional.

4.4. Alterações bilaterais em um modelo de dano isquêmico focal

A hipoperfusão focal desencadeia vários processos neuroquímicos no cérebro. Na zona de penumbra (região no entorno da área infartada), a redução do fluxo sanguíneo cerebral é atenuada pela perfusão residual de vasos sanguíneos colaterais, preservando o metabolismo energético e o gradiente eletroquímico de membrana (Donnan, Davis, and Sharp 2007). Essa região periférica pode passar por alterações celulares para evitar a evolução do infarto, bem como para adaptar-se a situação metabólica vigente pós-FPI. No Capítulo 1, nossos resultados apontaram para o surgimento de modulações em ambos os hemisférios cerebrais após indução de FPI, com destaque para adaptações neuroquímicas envolvendo o metabolismo do glutamato e do lactato (Nonose et al. 2018) (vide discussão adiante). A lesão isquêmica causou alterações tanto na zona de peri-infarto do hemisfério ipsilateral quanto na região equivalente no hemisfério contralateral. Algumas alterações estavam presentes somente a curto prazo (2 dias pós-FPI), enquanto outras persistiram ou surgiram após o período agudo (9 dias pós-FPI).

Mesmo não apresentando reatividade astrocitária, o hemisfério contralateral sofreu alterações metabólicas e inflamatórias juntamente com ou separadamente do hemisfério lesionado após a indução da FPI, indicando que aquela região pode ter sido recrutada para compensar a falha energética, bem como as citocinas podem ter, de alguma forma, influenciado tais alterações. Distúrbio e adaptação metabólicos desempenham um papel importante na IC, e o entendimento dos mecanismos responsáveis pode auxiliar na busca por tratamentos efetivos (Yang et al. 2012).

Outros trabalhos já reportaram que lesões focais podem afetar regiões distais, sugerindo que os efeitos fisiológicos da IC são melhor avaliados quando se considera um efeito “em rede” e não apenas no local do dano estrutural (Carter et al. 2010). Compreender a dinâmica temporal dessas mudanças inter-hemisféricas é crucial para decifrar o papel do córtex contralateral nos processos de reorganização funcional em diferentes estágios pós-lesão. Nos próximos parágrafos, seguem as possíveis implicações das alterações ipsi-, contra-, ou bilaterais no modelo de FPI.

4.5. Influência de citocinas e fatores tróficos nos transportadores

É possível que alguns dos parâmetros avaliados nessa tese tenham sido influenciados pela liberação de citocinas e fatores tróficos (questão abordada no Capítulo 1). O TNF- α é uma citocina envolvida na resposta inflamatória desencadeada pela IC, e seus níveis podem permanecer elevados no tecido cerebral afetado até 9 dias pós-FPI (Nonose et al. 2018). No entanto, sua função na patofisiologia da IC é controversa, apresentando efeitos tanto deletérios como neuroprotetores. Resumidamente, sabe-se que o TNF- α pode estimular a ativação (gliose reativa) e a proliferação de astrócitos (Selmaj et al. 1990) de forma parácrina e/ou autócrina, bem como ter efeitos negativos na captação e degradação do glutamato. A ativação da via envolvendo a via do TNFR1-caspase 3 (receptor 1 de TNF, baixa afinidade) resulta na clivagem do EAAT2 no domínio intracelular C-terminal do transportador de glutamato, tornando-o inativo (Boston-Howes et al. 2006). A estimulação da via NF κ B (fator nuclear kappa b) em astrócitos por TNF- α diminui a transcrição e expressão de EAAT2 na membrana glial (Sitcheran et al. 2005), o que pode ter contribuído para os resultados que observamos na expressão de GLT-1 nos Capítulos 1 e 2 da presente tese (grupo Isquemia e grupo IS, respectivamente). Entretanto, Bruce et al. (1996) demonstraram que o dano aos neurônios por IC focal e excitotoxicidade foi aumentado em camundongos nocaute para os receptores de TNF, sugerindo um efeito neuroprotetor dessa citocina. Taoufik et al (2008) demonstraram que efeitos neuroprotetores contra a excitotoxicidade do NMDA em modelos de privação de oxigênio e glicose exigiam a presença de TNFR1, sendo que a ativação deste sensibiliza os neurônios às ações da eritropoietina e de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) pós-MCAO. A partir desses dados, pode-se concluir que essa

citocina tenha um efeito tanto deletério quanto neuroprotetor, e sua modulação predominante talvez seja definida por outros fatores.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória, pró-coagulante e com efeitos modulatórios sobre o crescimento celular. Sua presença no SNC é atribuída a diversos tipos celulares, como endotélio, microglia, astrócitos e neurônios (Touzani et al. 1999)[2]. Os efeitos da IL-1 β no dano celular isquêmico, sejam eles benéficos ou prejudiciais, podem depender de uma ampla gama de fatores de interação, uma vez que essa interleucina pode estimular a síntese de outros fatores de crescimento, neuropeptídeos e citocinas (Sobowale et al. 2016). No Capítulo 1, observamos um aumento de IL-1 β em ambos os hemisférios cerebrais 2 dias pós-FPI, enquanto que aos 9 dias observamos um aumento apenas no hemisfério contralateral à lesão (Nonose et al. 2018), sugerindo que os níveis de IL-1 β poderiam estar relacionados à fase inicial da formação da cicatriz glial no hemisfério ipsilateral neste modelo experimental, de maneira que esta citocina poderia ser importante por conduzir a formação dessa barreira física (Liu et al. 2020). Quanto ao resultado no hemisfério contralateral, estudos anteriores também já relataram um aumento da expressão de IL-1 β no hemisfério intacto (Zhang et al. 1998; Davies et al. 1999). O significado desta expressão remota é desconhecido, mas não está associado à morte celular evidente.

Neurotrofinas, como o BDNF, são moduladores importantes para a sobrevivência e funções neuronais, sendo capazes de promover a liberação de citocinas anti-inflamatórias e diminuir a expressão de TNF- α (Jiang et al. 2010). Além de proteger os neurônios de danos causados por vários tipos de insultos, o BDNF também modula a neurotransmissão e desempenha um papel na plasticidade sináptica (Bramham and Messaoudi 2005). No Capítulo 1, nossos resultados mostraram que a diminuição dos níveis de BDNF não foi capaz de promover uma resposta anti-inflamatória, pelo menos não sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β . Além disso, o BDNF também é conhecido por modular a expressão de MCT2 (Robinet and Pellerin 2011). No Capítulo 1, a diminuição dos níveis de BDNF no hemisfério contralateral foi acompanhada de uma redução no imunoconteúdo de MCT2 na fase aguda (2 dias pós-FPI), indicando uma regulação direta desse fator trófico sobre o transportador (Robinet and Pellerin 2010) (a importância dessa modulação sobre MCT2 é discutida mais adiante). Além disso, esses resultados sugerem que algumas

adaptações ocorrem primeiro no hemisfério intacto e que podem ter uma função na adaptação metabólica à patofisiologia da IC.

4.6. Expressão de mRNA e atividade de GLAST e GLT-1 após indução de FPI

Uma das funções primordiais dos astrócitos no cérebro consiste na remoção do glutamato da fenda sináptica por meio de transporte especializado, sendo este um processo energeticamente custoso (Kreft et al. 2012; McKenna 2007). Nessa tese, observamos uma diminuição paradoxal na expressão dos transportadores de glutamato acompanhada por um aumento de sua atividade (Capítulos 1 e 2). Esses resultados revelam que o aumento na captação de glutamato não é necessariamente antecedido por maior expressão dos seus transportadores após FPI. Além disso, a diminuição da expressão gênica dos transportadores de glutamato pode não representar perda de conteúdo proteico ou, ainda, pode não ser responsável pela perda de sua atividade funcional. Além disso, é importante considerar que a atividade de captação é avaliada após a estabilização das fatias corticais em tampão oxigenado e suplementado com glicose, o que pode restaurar sua atividade dependente do gradiente Na^+/K^+ (Anderson and Swanson 2000; Danbolt 2001).

O aumento da disponibilidade de glutamato no espaço extracelular, como esperado na fase aguda da IC, também poderia potencializar a função do GLT-1, uma vez que o glutamato é um agonista muito eficaz (Takatsuru, Nabekura, and Koibuchi 2014). Adicionalmente, estudos já demonstraram que os neurônios estão diretamente envolvidos na regulação da expressão de GLT-1 e GLAST (Gegelashvili et al., 1997; Swanson et al., 1997; Schlag et al., 1998), o que pode indicar que a regulação negativa observada nesta tese pode ser uma consequência da morte neuronal induzida pelo dano isquêmico ou pela redução da atividade sináptica em ambos os hemisférios cerebrais nas áreas analisadas. Também é possível que os processos neuroquímicos decorrentes do dano isquêmico por FPI no *core* tenha exercido uma influência na expressão desses transportadores na zona de penumbra (vide abaixo).

Por fim, no Capítulo 1, nossos resultados mostraram que a FPI altera não apenas a expressão de GLT-1 no hemisfério lesado, mas também no hemisfério intacto 2 e 9 dias após a lesão. Curiosamente, nossos dados indicam que a regulação nos níveis de expressão está conectada entre os hemisférios cerebrais e que o GLT-1 pode desempenhar um papel na resposta ao dano isquêmico no hemisfério intacto.

Existem evidências clínicas que demonstram a reorganização no córtex somato-sensorial contralateral ao infarto, e que esta desempenha um importante papel na compensação funcional pós-IC (Chollet et al. 1991; Wittenberg et al. 2003). Também já foi reportada a ocorrência de brotamentos axonais (*axonal sprout*) no hemisfério contralateral ao córtex somato-sensório, sugerindo que alterações nos circuitos neuronais pode ser induzida no hemisfério intacto à lesão isquêmica durante a recuperação funcional (Takatsuru et al. 2009). Apesar dessas evidências, os eventos biológicos responsáveis ainda não foram elucidados.

4.7. Alterações interhemisférios envolvendo glutamato e lactato

No Capítulo 1, nossos resultados sugerem que o metabolismo energético cerebral e o sistema glutamatérgico sofrem modulações sincrônicas entre os hemisférios cerebrais pós-FPI. Além disso, observamos um aumento na captação de glutamato simultaneamente ao aumento da oxidação de lactato em ambos os hemisférios cerebrais (região cortical de interesse), sugerindo que o glutamato pode estar sendo metabolizado pelo ciclo do TCA e convertido em lactato pelos astrócitos. Em seguida, esse lactato seria exportado para os neurônios como suporte energético (McKenna 2013) (Figura 9). Esse resultado sugere uma participação do hemisfério contralateral na tentativa de conter a evolução do infarto na fase aguda da lesão isquêmica; entretanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

No Capítulo 2, demonstramos que a atividade da enzima GS está comprometida no grupo IS 2 dias pós-FPI (Fig.5A, 5B). Considerando que a proporção de glutamato oxidado pelo ciclo do TCA é diretamente dependente de sua concentração extracelular, ao mesmo tempo que é inversamente proporcional à sua conversão em glutamina (McKenna et al. 1996), isso reforçaria a hipótese de que, em astrócitos, o glutamato está sendo metabolizado majoritariamente pela glutamato desidrogenase (GDH) (Frigerio et al. 2008) na fase aguda da lesão de FPI.

Sabendo que o compartimento neuronal apresenta um metabolismo oxidativo mais pronunciado, acreditamos que o glutamato, após sua entrada no ciclo do TCA como α -cetoglutarato, possa ser convertido em lactato pela rota da enzima málica (ME) e destinado ao suporte energético neuronal. Sabe-se que o malato pode desempenhar um papel importante no acoplamento metabólico entre astrócitos e neurônios (McKenna et al. 1990; Shank and Campbell 1984a; 1984b) e que sua

conversão em piruvato pela ME é essencial para a oxidação completa da glutamina, um importante substrato energético para as células neurais (Zielke et al. 1978). Sonnewald e colaboradores (1993) já sugeriram que a ME tem um papel essencial na síntese de lactato a partir do glutamato quando esse neurotransmissor está em altas concentrações no meio extracelular. Em um estudo detalhado das isoformas mitocondrial e citosólica da ME, demonstrou-se que o glutamato (*i.e.*, captado pelo astrócito) não exerce influência sobre a atividade da isoforma citosólica, mas afeta a ME de alta afinidade para malato da fração mitocondrial, aumentando ainda mais sua afinidade (diminuição do K_m), ao mesmo tempo que diminui sua V_{max} . Dessa forma, o glutamato parece exercer um efeito que diminui a capacidade dessa isoforma em realizar a conversão malato-piruvato na mitocôndria (diminuição de 34%). Isso sugere que a reação citosólica da ME poderia direcionar a oxidação dos carbonos do glutamato para o neurônio, uma vez que a sua conversão em piruvato para a oxidação completa de seus carbonos pelo ciclo do TCA do astrócito está sendo desestimulado por essa regulação (Figura 9). O lactato parece influenciar negativamente a isoforma citosólica da ME, mas tal efeito é abolido conforme aumenta a disponibilidade de malato.

Também podemos considerar que a exportação de malato ou até mesmo de α -cetoglutarato possa acontecer (Shank and Campbell 1984). Em condições patológicas em que o fornecimento de glicose e oxigênio está comprometido, como na IC, o conteúdo de intermediários do ciclo do TCA como α -cetoglutarato e malato podem estar depletados e os neurônios podem depender de uma fonte extrínseca (*i.e.*, astrócitos) para repor esses compostos. Esse mecanismo, assim como outras interações entre astrócitos e neurônios, indicam fortemente que a astroglia auxilia a anaplerose do metabolismo neuronal por meio de vias metabólicas alternativas, como a que consta no mecanismo proposto na Figura 9. Esta hipótese pode justificar os resultados interhemisférios encontrados no Capítulo 1, entretanto ela possui somente fundamentação teórica, mas não experimental, uma vez que ela não foi testada na presente tese.

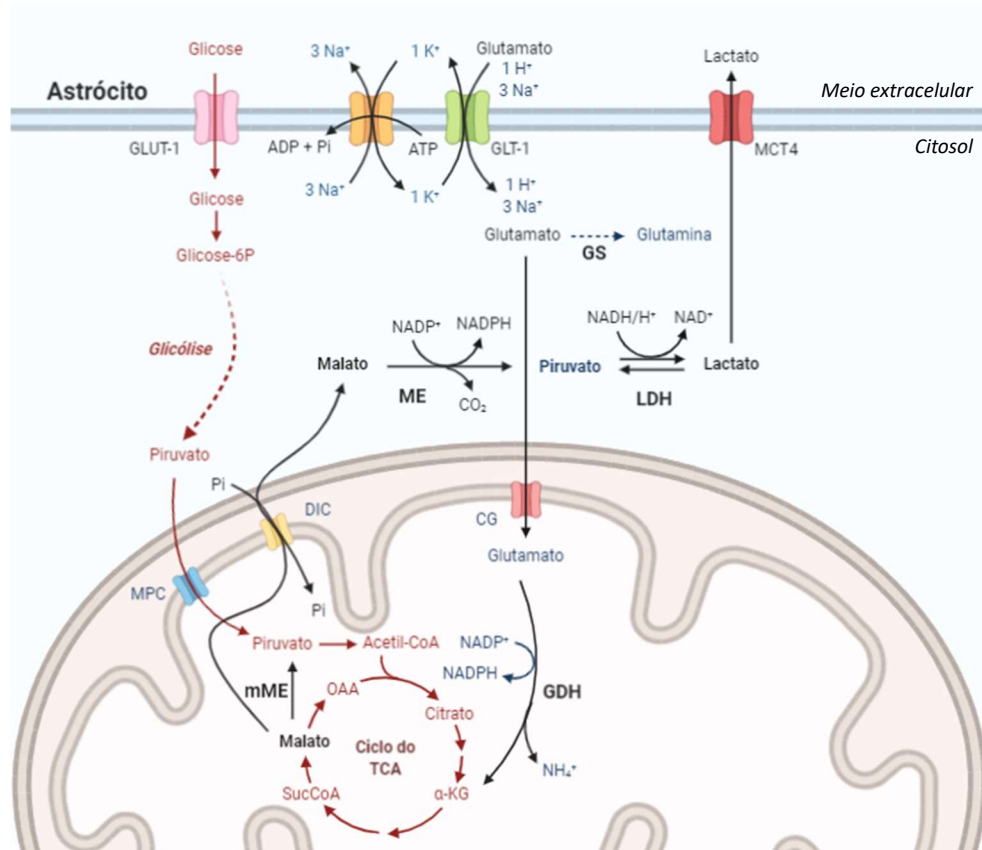


Figura 9. Mecanismo sugerido para explicar a relação metabólica glutamato-lactato que foi observada simultaneamente em ambos os hemisférios cerebrais 2 dias após IC induzida por FPI (Capítulo 1). Podemos hipotetizar que: (i) o glutamato é captado pelos transportadores eletrogênicos; (ii) sua conversão em glutamina está prejudicada 2 dias pós-FPI (Capítulo 2), sendo então destinado para oxidação; (iii) o glutamato é carregado para a matriz mitocondrial e sofre desaminação oxidativa pela GDH, formando íon amônio e α -KG; (iv) a entrada de glutamato sobre a forma de α -KG no ciclo do TCA estimularia sua saída da mitocôndria como malato por meio do carreador mitocondrial de dicarboxilato em troca de um fosfato inorgânico; (v) no citosol, o malato seria convertido a piruvato pela enzima málica; (vi) a lactato desidrogenase converte o piruvato em lactato, o qual é exportado para utilização neuronal através dos transportadores de monocarboxilatos (nesse caso, pelo MCT4). Abreviações: α -KG, alfa-cetoglutarato; CG, carreador de glutamato; DIC, carreador mitocondrial de dicarboxilato; GDH, glutamato desidrogenase; LDH, lactato desidrogenase; ME, enzima málica; mME, enzima málica mitocondrial; OAA, oxaloacetato; SucCoA, succinil-CoA. Fonte: a autora (figura elaborada no BioRender).

Por fim, 9 dias pós-FPI, as taxas de oxidação tanto do lactato quanto do glutamato continuaram elevadas no hemisfério ipsilateral, o que sugere que esses substratos têm um papel importante na adaptação metabólica frente ao insulto isquêmico, uma vez que efeitos em seu metabolismo persistiram. Nenhuma mudança significativa foi encontrada no hemisfério contralateral do grupo Isquemia em relação ao mesmo hemisfério do grupo Sham nesse mesmo período de tempo, indicando que alterações metabólicas no hemisfério intacto podem ter uma função somente na fase aguda no modelo de FPI.

4.8. Expressão dos transportadores MCT

Para investigar o envolvimento dos MCTs e dos transportadores de glutamato nas modulações descritas até agora nessa tese, foram realizadas análises de imunoconteúdo por WB ou análise de expressão gênica por RT-PCRq. No Capítulo 1, observamos uma diminuição dos níveis proteicos de MCT2 no hemisfério contralateral, acompanhada por um aumento dos níveis de MCT4 2 dias pós-FPI. Sabe-se que os MCTs são regulados de maneira mais acentuada ao nível de tradução proteica (Halestrap 2013). O MCT4, transportador localizado em astrócitos no cérebro de roedores (Rafiki et al. 2003), tem sua expressão ligada à tensão de oxigênio (Singh, Sharma, and Mishra 2012; Rosafio and Pellerin 2014; Bergersen 2015). Sob condições de hipóxia, sua expressão é regulada através do fator de transcrição HIF-1 α . Wiener e colaboradores (1996) já descreveram que a lesão induzida por FPI no cérebro aumenta a expressão de mRNA para HIF-1 α na região da penumbra. Após 2 dias da lesão, o imunoconteúdo de MCT4 mostrou-se aumentado apenas no hemisfério contralateral no grupo Isquemia, sugerindo que o córtex ipsilateral não conseguiu responder tão rapidamente (fase aguda da lesão). Entretanto, aos 9 dias, a regulação positiva do imunoconteúdo de MCT4 foi observada em ambos os hemisférios cerebrais. Esses resultados indicam que: (i) o HIF-1 α poderia ter um efeito de sinalização mais prolongado no modelo de FPI, uma vez que seus efeitos nos níveis de MCT4 ainda puderam ser observados após 9 dias (Nonose et al. 2018); e (ii) o MCT4 poderia atuar como um substituto para o MCT2 (hipótese discutida abaixo). Uma perspectiva para este trabalho seria avaliar a expressão de HIF-1 α no modelo de FPI, uma vez que não realizamos esta medida, bem como realizar uma marcação imunohistoquímica com co-localização dos transportadores e proteínas de citoesqueleto para verificar sua localização célula-específica.

O MCT2 é principalmente encontrado em processos e espinhos dendríticos neuronais, e sua expressão não é influenciada pelo HIF-1 α (Pierre, Magistretti, and Pellerin 2002; Bergersen 2015). Entretanto, nossos resultados sugerem que o MCT2 poderia ter sua função substituída pela expressão de MCT4 em neurônios considerando o relato de Rosafio e colegas (2016). Os autores observaram a expressão de MCT4 em neurônios em um modelo de MCAO 24 h após reperfusão, embora esse transportador seja considerado exclusivo de astrócitos sob condições fisiológicas (Pellerin et al. 2005). É importante observar que o Km do MCT4 (30

mmol/L) é considerado elevado, enquanto que o Km do MCT2 (menos que 1 mmol/L) sugere que este último estará geralmente saturado. A hipótese de que os neurônios possam expressar MCT4 em condições de hipóxia é interessante, pois dessa forma o transporte de lactato teria uma tendência a aumentar conforme a disponibilidade de substrato (Bergersen 2015).

A fase aguda da IC é conhecida por aumentar o metabolismo anaeróbico da glicose e, conseqüentemente, aumentar a liberação de lactato no meio extracelular. O lactato é comumente considerado um marcador da isquemia, mas a sua eliminação durante evento hipóxico causa um dano cerebral significativamente maior do que o seu acúmulo, sendo grandes concentrações de lactato associadas com neuroproteção (Ohki et al. 1999). Além disso, uma revisão recente da literatura concluiu que a produção endógena de lactato durante hipóxia-isquemia parece apresentar um efeito protetor para o cérebro (Taher et al. 2016). Em concordância com esse relato, nossos resultados do Capítulo 1 reforçam essa possibilidade, uma vez que observamos uma adaptação dos MCTs a fim de potencializar o transporte de lactato, o que persistiu até 9 dias pós-FPI. Maiores investigações são necessárias para entender sua participação nas alterações contralaterais em modelos de oclusão permanente.

No Capítulo 2, observamos que o aumento na taxa oxidativa de lactato causado pela FPI foi totalmente prevenida pelo CTXpre, sugerindo que, nos paradigmas investigados, o lactato não parece ser utilizado como substrato energético. É possível que um dos mecanismos ativados pelo CTXpre diminua a produção de lactato por atenuar a via glicolítica e potencializar o consumo de substratos alternativos, como o glutamato (vide abaixo) pós-FPI. É importante ressaltar que o L-lactato pode agir como molécula sinalizadora no cérebro com o potencial de alterar a atividade neuronal por uma variedade de mecanismos (Mosienko, Teschemacher, and Kasparov 2015). Um dos mais estudados recentemente é a sua ligação no receptor GPR81 (*G-protein-coupled receptors*, receptores acoplados a proteína G). Entretanto, seus efeitos parecem depender de uma concentração extremamente elevada de L-Lactato no meio extracelular (5mM ou mais), sendo possível sugerir que ele tenha uma função sob condições isquêmicas ou de atividade neuronal extenuante. Sua função em protocolos de PC e IT necessitam de maiores investigações.

4.9. O CTXpre teve efeito na captação de glutamato por um mecanismo indireto no modelo de FPI

No Capítulo 2, realizamos uma intervenção com potencial de estimular o metabolismo do glutamato por aumentar sua captação pelos astrócitos. Quanto às alterações neuroquímicas, observamos que: (i) um pré-tratamento conhecido por aumentar a expressão de GLT-1 (CTX, 200 mg/kg/dia, por 5 dias, i.p.) não preveniu sua diminuição pós-FPI, sugerindo que a reperfusão pode ser um fator crucial no restabelecimento dos transportadores de glutamato; e (ii) por estimular o desvio do glutamato para oxidação e para a síntese de glutamina, foi possível aumentar a atividade de transporte mesmo com o baixo imunoconteúdo de GLT-1, indicando que é possível prevenir danos excitotóxicos por compensação metabólica. A maior parte dos estudos já realizados com CTX foram realizados em modelos de oclusão transitória, nos quais o potencial neuroprotetor desse fármaco foi atribuído majoritariamente à regulação positiva da expressão de GLT-1 (Inui et al. 2013; Krzyzanowska et al. 2016; Krzyzanowska and Pomierny 2017). Neste trabalho, demonstramos que o efeito dessa mesma droga vai além, modulando o metabolismo cerebral em oclusão permanente. A investigação pré-clínica deve atentar para essas variações entre modelos experimentais para auxiliar na transposição de terapias farmacológicas para a clínica.

4.10. Análise da performance comportamental demonstra efeitos neuroprotetores do CTXpre

Para avaliar a eficácia terapêutica de uma intervenção em modelos experimentais de AVE in vivo, tipicamente é realizada a determinação histológica do volume de infarto. Entretanto, muitos estudos experimentais contam apenas com essa medida como evidência para neuroproteção. Embora certamente seja uma forma objetiva de comparar resultados, este procedimento difere substancialmente das medidas de efeito utilizadas no ambiente clínico. A avaliação do resultado funcional por meio de scores neurológicos é mais útil para determinarmos o desfecho primário da intervenção terapêutica. Além disso, estudos com roedores relatam que o tamanho da lesão não se correlaciona necessariamente com déficits funcionais e resultados comportamentais relevantes, de forma que a determinação do volume da lesão é insuficiente para evidenciar neuroproteção (Hunter et al. 2000; Markgraf et al. 1994;

Zhang et al. 2000). Testes comportamentais pós-IC têm potencial para preencher essa lacuna entre pesquisa clínica e pré-clínica (Balkaya et al. 2013).

No capítulo 2, realizamos um pré-tratamento com CTX e, após a indução de FPI, acompanhamos a performance motora dos animais ao longo de seis semanas por meio de dois testes comportamentais. No teste do cilindro, todos os animais que foram submetidos à isquemia (grupos IS e ICTX) apresentaram uma nítida preferência pelo uso do membro ipsilateral 2 dias pós-FPI, obtendo uma notável redução na taxa de simetria. Esse resultado indica que o pré-tratamento não pode prevenir e/ou melhorar a simetria do membro anterior logo após a lesão, apesar da redução significativa do volume de infarto no grupo ICTX. Ao longo do monitoramento, observamos apenas melhorias sutis até os dias 28 e 35 e, ao final da avaliação, apenas um terço dos animais ICTX exibiram taxas de simetria semelhantes ao grupo controle. Isso pode ser devido à natureza do teste do cilindro, que fornece apenas um dado sobre a preferência do membro anterior. Por este motivo, também submetemos os animais à avaliação neurológica de García, que tem a vantagem de pontuar o grau de dano causado pela isquemia cerebral induzida dentro de cada categoria sensório-motora (Garcia et al. 1995), podendo adicionar a gravidade da lesão à análise.

No *score* neurológico, a lesão isquêmica teve uma grande influência na baixa pontuação dos animais 2 dias pós-FPI, corroborando os achados do teste do cilindro neste momento inicial. Ao longo do tempo de análise, observamos que o CTXpre teve uma influência positiva na recuperação motora dos animais ICTX, que apresentaram uma recuperação funcional progressiva e exibiram um desempenho semelhante ao grupo controle ao final de seis semanas. O grupo IS apresentou uma recuperação mais lenta, terminando com escores inferiores. As evidências sugerem que o reparo neurológico pode ocorrer por meio da reorganização cerebral (i.e., reposicionamento de sinapses no córtex lesionado) ou, alternativamente, por meio de um mecanismo compensatório ativado por uma atividade contralesional inicial (Hatem et al. 2016). No entanto, uma boa recuperação motora depende mais do recrutamento da rede funcional original, em vez de compensação pelo hemisfério contralateral (Rehme and Grefkes 2013). Aqui, nossos resultados indicam que: (i) CTXpre não preveniu o prejuízo motor a curto prazo pós-FPI; (ii) as alterações neuroquímicas precoces induzidas pelo CTXpre podem ter facilitado a reorganização da rede funcional original, potencializando a reabilitação motora a longo prazo no grupo ICTX.

Após o acompanhamento de seis semanas, os animais foram submetidos ao NORT para avaliação da capacidade de reconhecimento e memória dos animais, uma vez que uma das manifestações clínicas mais comuns é a alteração das funções cognitivas, com alguns pacientes apresentando distúrbios de memória que podem persistir por vários meses após a incidência da IC (Surawan et al. 2018; Tan et al. 2017). Pudemos observar que o grupo IS não foi capaz de reconhecer o novo objeto após um curto período de retenção (90 min). Sabe-se que as regiões corticais no lobo temporal mediano são altamente integradas ao hipocampo, com o córtex perirrinal relacionado ao reconhecimento após curtos intervalos de retenção (Reger, Hovda, and Giza 2009). Nesta tese, observamos que essas áreas corticais, apesar de estruturalmente viáveis, exibiram um metabolismo energético prejudicado logo após a isquemia no grupo IS. Tais alterações podem persistir no hemisfério ipsilateral pelo menos até 9 dias pós-FPI, conforme demonstrado (Nonose et al. 2018). É possível que essa disfunção energética no grupo IS possa ter prejudicado a integridade do lobo temporal mediano e, conseqüentemente, comprometido a memória de curto prazo dos animais (Hammond, Tull, and Stackman 2004). Por outro lado, o grupo ICTX reconheceu o objeto novo na 1ª tarefa, demonstrando que o CTXpre preveniu esse distúrbio.

Estudos anteriores também observaram efeitos benéficos do CTXpre na melhoria comportamental de animais submetidos à IC; porém, como mencionado anteriormente, o modelo de MCAO é o mais utilizado e a análise comportamental é geralmente realizada em um curto prazo após reperfusão (Krzyzanowska et al. 2016; Thone-Reineke et al. 2008; Sommer 2017). No Capítulo 2 da presente tese, observamos que a análise sensório-motora em um modelo de oclusão permanente pode não manifestar efeitos neuroprotetores a curto prazo, mas que alterações neuroquímicas provocadas pela intervenção terapêutica podem se revelar tardiamente na performance dos animais.

4.11. A regulação da expressão de GLT-1 pós-IC pode depender de reperfusão

Estudos anteriores mostraram que o CTXpre (100-200 mg/kg/dia, 5 dias, i.p.) é neuroprotetor por meio do aumento da expressão de GLT-1 e de sua atividade de captação (Rothstein et al. 2005), resultando na redução do volume de infarto em modelos isquêmicos. Essas alterações foram relatadas na oclusão da artéria cerebral

média (Chu et al. 2007; Verma et al. 2010), isquemia transiente do prosencéfalo (Ouyang et al. 2007) e isquemia global (Hu et al. 2015), geralmente após um período de reperfusão. Embora tenhamos observado uma diminuição do volume de infarto, o CTXpre não conseguiu evitar a queda na expressão de GLT-1 logo após a indução de FPI (Capítulo 2). Considerando que (i) o grupo SCTX exibiu níveis aumentados de mRNA e de proteína de GLT-1; e (ii) o dano induzido pelo modelo de FPI é permanente (sem reperfusão), a regulação negativa de GLT-1 pode representar um mecanismo de proteção endógeno que anulou a regulação positiva do pré-tratamento. No núcleo isquêmico, o GLT-1 pode contribuir para o aumento do glutamato extracelular, pois seu transporte é eletrogênico e pode operar em reverso (Krzyzanowska et al. 2014). Assim, é possível que, ao induzir uma oclusão permanente, a área adjacente ao núcleo também sofra uma diminuição na expressão de GLT-1 para evitar um possível extravasamento de glutamato. Este resultado sugere que a reperfusão pode ser crítica para a regulação positiva da expressão de GLT-1 em modelos isquêmicos.

4.12. A atividade de GLT-1 pode ser potencializada pela reação da GS

Uma das funções astrocitárias mais importantes no cérebro é a captação de glutamato na fenda sináptica, sendo este um processo energeticamente custoso por depender de gradiente eletroquímico (McKenna 2013). Nesta tese, observamos uma diminuição na expressão e no imunoconteúdo de transportadores de glutamato acompanhados, paradoxalmente, por aumento de atividade desses transportadores. Esses resultados revelam que o aumento da captação de glutamato pode estar mais relacionado à concentração de substrato (glutamato) do que à expressão gênica dos transportadores no cérebro com/sob IC permanente. De fato, estudos anteriores constataram que nem a inibição da GS (Rothstein and Tabakoff 1985), nem do ciclo do TCA (Swanson and Graham 1994) são limitantes para a captação de glutamato pelos astrócitos. Reforçando essa hipótese, concentrações elevadas desse neurotransmissor na fenda sináptica podem estimular seu transporte, uma vez que o glutamato é um agonista muito eficaz (Takatsuru, Nabekura, and Koibuchi 2014), como pudemos observar nos nossos resultados (Capítulo 1 e 2).

No Capítulo 1, observamos que o dano induzido por FPI diminui a expressão de mRNA de GLT-1 em ambos hemisférios cerebrais, tanto 2 quanto 9 dias pós-FPI, sugerindo que essa alteração é persistente na ausência de reperfusão. No Capítulo

2, observamos que o CTXpre é capaz de aumentar a expressão gênica e proteica desse transportador (conforme visto no grupo SCTX, Fig. 3A, 3B), mas que esse efeito desaparece após a indução de FPI. Entretanto, observamos que essa intervenção preventiva teve um efeito sinérgico na atividade de captação de glutamato no grupo ICTX, sendo capaz de aumentar a captação de glutamato ainda mais intensamente quando comparado com o grupo não-tratado (IS).

Somando-se a isso, observamos que o CTXpre foi capaz de preservar o imunoconteúdo e a atividade da enzima GS pós-FPI (Capítulo 2). A GS é uma enzima crítica para a regulação dos níveis sinápticos de glutamato e está localizada principalmente em astrócitos, mas os dados sobre seu papel em modelos de AVE são controversos (Hoshi et al. 2006; Jeitner, Battaile, and Cooper 2015). Após FPI, observamos uma regulação negativa do imunoconteúdo e da atividade enzimática de GS, o que comprometeu a síntese de glutamina no grupo IS. Acredita-se que essa enzima seja sensível ao estresse oxidativo gerado durante o AVE (Jeitner, Battaile, and Cooper 2015), o que pode explicar o decréscimo observado. Seria de se esperar que a perda de GS aumentasse os níveis de glutamato no LCR, conforme observado no grupo IS (Fig. 3D, Capítulo 2). Por outro lado, o CTXpre preveniu esses efeitos, sendo capaz de manter os níveis de glutamina no LCR. A expressão / atividade aumentada de GS é conhecida por dar suporte à sobrevivência neuronal no cérebro lesado (Ramonet et al. 2004). Nas condições impostas pela lesão isquêmica, é provável que a conversão de glutamato em glutamina não ocorra de maneira eficiente (como observado no Capítulo 2, Fig. 5A, 5B), podendo induzir um acúmulo de glutamato no citoplasma astrocitário na região do peri-infarto (Ottersen et al. 1996).

Nesse cenário, hipotetizamos que o CTXpre pode ter aumentado a atividade de transporte de GLT-1 preservando a GS, uma vez que os níveis de proteína de GLT-1 estavam comprometidos. Nossos resultados forneceram evidências adicionais de que essa enzima pode ser usada como uma ferramenta para aumentar a captação de glutamato, também demonstrado por (Verma et al. 2010) e que os efeitos do pré-tratamento no transporte de glutamato podem ser indiretos em modelos experimentais de oclusão permanente.

4.13. Aumento persistente da taxa oxidativa de glutamato no grupo ICTX

Para verificar se o CTXpre foi capaz de modular outros aspectos além do transporte de glutamato, avaliamos o metabolismo energético por meio da oxidação do substrato em fatias corticais e os níveis de aminoácidos no LCR. A lesão de FPI aumentou a oxidação de substratos em animais não tratados (IS), conforme demonstrado anteriormente (Nonose et al. 2018). Esse hipermetabolismo na área peri-infarto pode estar relacionado à estimulação excitotóxica do receptor NMDA, já que o antagonista MK-801 parece preveni-lo (Liu et al. 1996). Nossos resultados sugerem que a maquinaria para oxidar substratos se encontra funcional e superativada devido às necessidades locais de energia (Fig. 4A, 4B, 4C). Curiosamente, CTXpre preveniu completamente o aumento do metabolismo oxidativo a partir de glicose e lactato, mas apenas parcialmente a partir de glutamato (Fig. 4B), sugerindo que CTXpre pode ter induzido um aumento preferencial na utilização de glutamato como substrato energético. Um estudo anterior realizado em cultura neuronal demonstrou que, quando a glicose não está disponível para o metabolismo mitocondrial, o glutamato é o substrato preferido porque pode adicionar carbono líquido ao ciclo do TCA, podendo substituí-la em sua função de anaplerose (Belanger, Allaman, and Magistretti 2011). Coletivamente, esses dados indicam que o CTXpre influencia as vias que ativam flexibilidade metabólica no cérebro, otimizando o metabolismo por meio do gerenciamento metabólico do glutamato.

4.14. Análise de aminoácidos sugere maior atividade glicolítica

Como os aminoácidos estão intimamente relacionados ao ciclo do TCA, avaliamos seus níveis no LCR por HPLC. Observamos aumento no pico Serina/Histidina em todos os grupos experimentais quando comparados ao controle (SS). Esse efeito parece ser causado não apenas pela lesão de FPI, mas também pelo CTXpre (Capítulo 2, Fig. 6A). É importante mencionar que o método de HPLC empregado nesta Tese não consegue separar os picos de serina e histidina um do outro (esses dois aminoácidos apresentam o mesmo tempo de retenção); portanto, o efeito observado pode ser devido a cada aminoácido individualmente ou à soma de suas concentrações. No entanto, devemos considerar outras evidências. Por exemplo, sabe-se que a histidina não é sintetizada no cérebro, mas ativamente transportada pela BHE (Kurbat and Lelevich 2009). No SNC, os dipeptídeos de histidina têm uma função antioxidante contra espécies reativas da peroxidação lipídica, mas sua função

ainda é pouco compreendida (Song et al. 2014). Por outro lado, o aminoácido serina participa do acoplamento metabólico astrócito-neurônio, estando relacionado à glicólise e à transmissão glutamatérgica. A D-serina é conhecida como um co-agonista essencial, juntamente com o glutamato, para a estimulação de receptores NMDA, e sua síntese está negativamente correlacionada com o fluxo glicolítico em astrócitos (Suzuki et al. 2015). Sua síntese é realizada pela enzima serina racemase, que utiliza a L-serina como substrato e tem sua atividade inversamente proporcional à razão NADH/NAD⁺ intracelular, enquanto que níveis altos de ATP também não favorecem sua atividade. Em contraste, a biossíntese de L-serina está positivamente correlacionada com a glicólise, sendo que sua síntese utiliza o 3-fosfoglicerato como precursor. Apesar dos dados de HPLC não fornecerem informações sobre qual isômero está presente, podemos inferir que, provavelmente, é L-serina, visto que tanto FPI quanto CTXpre são conhecidos por aumentar o fluxo glicolítico: o primeiro devido à hipoperfusão e diminuição da fosforilação oxidativa in vivo (Horikawa et al. 1985; Shin et al. 2020), e o segundo por aumentar a captação de [18F]FDG in vivo e a de glicose e glutamato in vitro de forma aguda (Zimmer et al. 2017). Juntamente com a preservação da GS, essa hipótese reforça que o principal alvo do CTXpre é o metabolismo astrocitário e que esse tipo celular pode ser crucial para a indução da IT.

4.15. Níveis de aspartato apontam para oxidação do glutamato no compartimento neuronal no grupo ICTX

Curiosamente, a biossíntese de (L-)serina já foi apontada como uma alteração citoplasmática que indica oxidação aumentada de glutamato em cultura de neurônios por Divakaruni e colaboradores (2017). Após induzirem farmacologicamente a inibição do carreador de piruvato mitocondrial, eles observaram que: (i) os carbonos derivados da glicose foram mais incorporados em piruvato e em serina do que em lactato; e (ii) a inibição da entrada do piruvato derivado da glicose na mitocôndria reduz significativamente a quantidade intracelular de glutamato enquanto aumenta a de aspartato. Essas mudanças sugerem que um citoplasma com status redox mais reduzido possa conduzir o glutamato para oxidação, tornando a lançadeira de malato-aspartato energeticamente mais favorável (Divakaruni et al. 2017) (Figura 10).

Em concordância, nossos achados indicaram um aumento nos níveis de aspartato no LCR de animais pré-tratados com CTX e submetidos a FPI (grupo ICTX;

Fig. 6B), sugerindo o envolvimento da aspartato aminotransferase (AAT). A AAT, também conhecida como aspartato transaminase, catalisa a transferência reversível do grupo amino do glutamato para o oxaloacetato, enquanto substitui o grupo amino do glutamato por um grupo carbonila. Essa reação enzimática catalisa a entrada do glutamato no ciclo do TCA em neurônios, visto que em astrócitos há um predomínio da atividade da GDH (Frigerio et al. 2008). Assumir que os níveis de aspartato no LCR no grupo ICTX representam a participação da lançadeira malato-aspartato já poderia indicar de que a oxidação de glutamato seja direcionada no compartimento neuronal, uma vez que, em astrócitos, essa lançadeira não é muito estimulada para não afetar a redução do piruvato a lactato (Bouzier-Sore and Pellerin 2013). A baixa transferência de equivalentes redutores por meio da lançadeira em astrócitos ajuda a direcionar a produção de lactato a partir do piruvato derivado da glicólise, um processo considerado fisiológico e bem estabelecido em astrócitos. Em conjunto, o CTXpre parece conduzir o glutamato para oxidação como substrato preferencial, atenuando a disfunção metabólica ao diminuir a produção de lactato e aumentando o catabolismo do glutamato após a isquemia. Entretanto, mais estudos são necessários para a verificação desse mecanismo.

4.16. A liberação de glutamato em preparação sinaptossomal

No Capítulo 2, obtivemos uma preparação sinaptossomal da região cortical de interesse para avaliar se o CTXpre e/ou a lesão de FPI poderia alterar a liberação vesicular de L-[³H]-Glutamato. Todos os grupos exibiram valores similares, sugerindo que a maquinaria responsável pela liberação de glutamato do terminal pré-sináptico não foi influenciada nem pela FPI, nem pelo CTXpre nas condições do ensaio (Fig. 3E, 3F). Entretanto, é possível que efeitos neuroprotetores relacionados à excitotoxicidade do glutamato não sejam somente por aumentar sua captação astrocitária, mas também por aumentar sua oxidação em neurônios e, conseqüentemente, reduzir a sua liberação do terminal pré-sináptico (Divakaruni et al. 2017).

Apesar de estar intimamente relacionado com o ciclo do TCA e com a regulação das demandas energéticas cerebrais, o metabolismo neuronal do glutamato é comumente compartimentalizado às vesículas sinápticas por sua função como neurotransmissor, o que negligencia seu papel como intermediário metabólico

(McKenna et al. 2012; Schousboe, Bak, and Waagepetersen 2013; Daikhin and Yudkoff 2000). Já foi sugerido que a abundância do *pool* neuronal de glutamato pode ser ajustada pelo metabolismo do ciclo do TCA, sendo este o mecanismo proposto para explicar a neuroproteção mediada por dietas cetogênicas em quadros como epilepsia (Masino and Rho 2010; Lutas and Yellen 2013). O glutamato é o único substrato capaz de substituir a glicose como substrato energético majoritário, uma vez que seus carbonos conseguem compensar pela anaplerose da glicose, abastecendo os *pools* de intermediários do ciclo do TCA que são desviados para biossíntese (Divakaruni et al. 2017). Outros substratos, apesar de gerarem NADH e FADH₂ para dirigir a síntese de ATP acoplada à cadeia transportadora de elétrons, são incapazes de contribuir com a adição real de carbonos para a manutenção do *pool* dos intermediários do ciclo do TCA.

A técnica que empregamos para a avaliação da liberação de L-[³H]-Glutamato consiste em, primeiramente, estimular sua captação sinaptossomal para preencher as vesículas com glutamato marcado radioativamente. Posteriormente, avaliamos sua liberação basal ou estimulada por K⁺ e quantificamos por cintilação. Dessa forma, a técnica nos permite avaliar apenas a maquinaria envolvida na liberação, uma vez que o *pool* de glutamato medido é diferente do *pool* existente nos terminais pré-sinápticos. Em nossos resultados, nem a lesão de FPI, nem o CTXpre foram capazes de influenciar os mecanismos de liberação sinaptossomal de glutamato. Uma maneira de tentar evitar esse viés seria a utilização de um ensaio eletrofisiológico de *patch clamp* para medir o potencial evocado pela liberação de glutamato. Se a oxidação de glutamato diminuir sua disponibilidade para empacotamento vesicular, uma menor liberação desse neurotransmissor seria detectada pela diminuição da densidade da corrente do pico.

4.17. Efeitos da FPI e do CTXpre no metabolismo de valina e triptofano

Sabe-se que os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs, *i.e.*, Leucina, Isoleucina e Valina) podem servir como importantes doadores de grupos amino para a síntese de glutamato no cérebro (Yudkoff 1997). A atividade da transaminase dos BCAAs é abundante no cérebro e os neurônios têm uma grande capacidade para oxidar esses aminoácidos. No Capítulo 2, observamos uma diminuição dos níveis de Valina no grupo ICTX logo após FPI (2 dias), indicando um aumento do catabolismo

desse aminoácido quando comparado ao grupo IS. A Valina pode ser convertida em seu alfa-cetoácido por transaminação e, após uma série de reações, entra no ciclo de TCA como succinil-CoA. Um estudo anterior de Bak e colaboradores (2013) demonstrou que a Valina (em vez de Leucina ou Isoleucina) era capaz de manter o *pool* de glutamato em resposta à despolarização repetida em neurônios cerebelares. Assim, formulamos a hipótese de que o CTXpre pode estimular a oxidação de Valina e/ou utilizá-la para manter o *pool* de glutamato 2 dias após FPI.

Nossos resultados também indicaram que a FPI aumentou os níveis de triptofano no grupo IS (Capítulo 2, Fig. 6D). Triptofano é um aminoácido essencial e deve vir da dieta. No cérebro, esse aminoácido é precursor da serotonina e manipulações dietéticas que afetam sua disponibilidade para o cérebro têm sido empregadas como uma ferramenta para investigar o envolvimento da serotonina no comportamento, no humor e na cognição em humanos (Höglund, Øverli, and Winberg 2019). O acúmulo de triptofano pode indicar que as reações biossintéticas que o utilizam como precursor podem não estar ocorrendo após a FPI. Uma investigação a longo prazo dos níveis de aminoácidos no LCR poderia proporcionar maiores informações acerca do metabolismo cerebral durante o período de recuperação (Capítulo 2, seis semanas), uma vez que, se esse acúmulo for persistente, poderia influenciar funções cognitivas, como o reconhecimento de novos objetos no grupo IS (Capítulo 2, Fig. 1G).

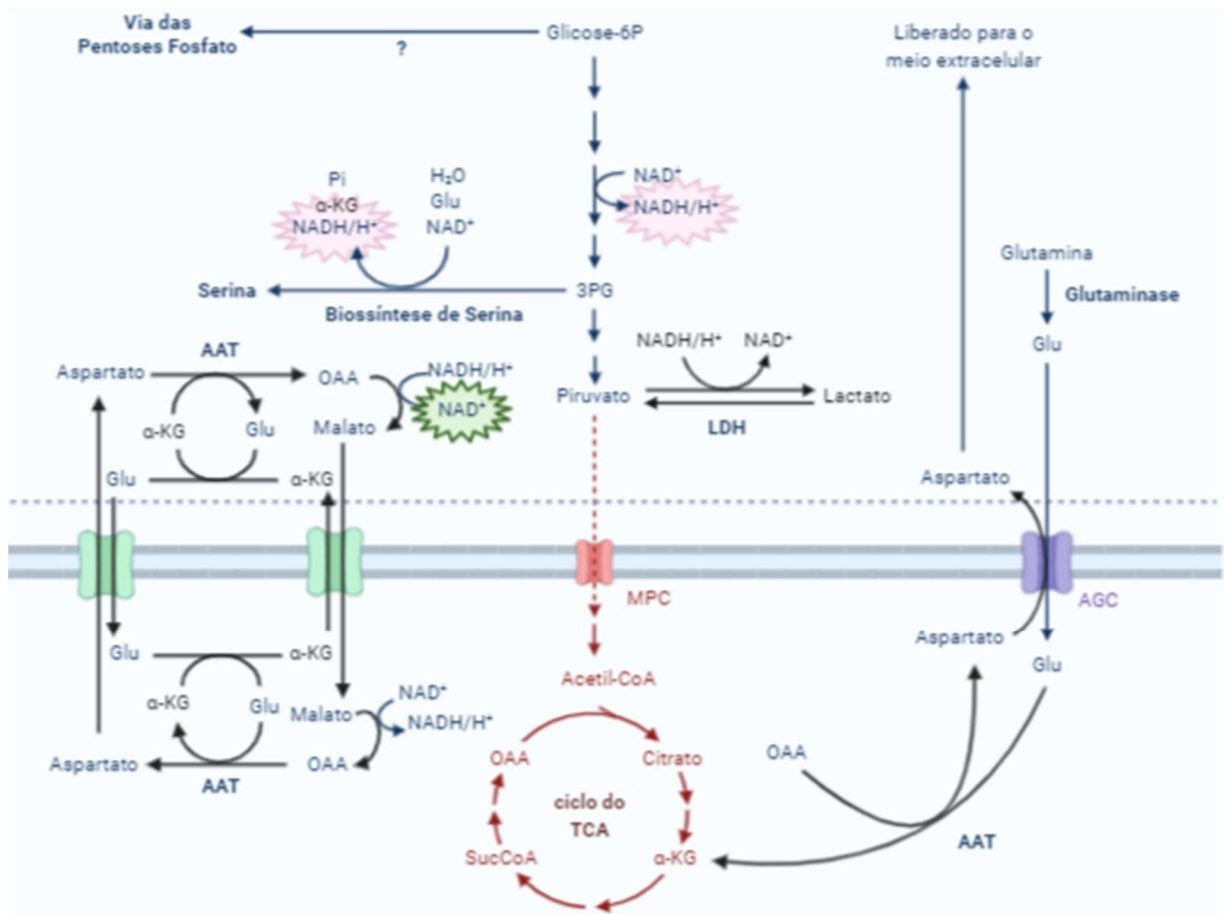


Figura 10. A maior disponibilidade de Aspartato no LCR nos conduziu à hipótese de que a oxidação de glutamato aconteceria majoritariamente no compartimento neuronal. Podemos observar que a ativação da glicólise, bem como a síntese de Serina no citoplasma, acarretariam em um ambiente mais reduzido, impulsionando a oxidação do glutamato através da lançadeira malato-aspartato (à esquerda). O neurônio captaria a glutamina disponível no LCR e, após sua conversão em glutamato pela enzima glutaminase, seus carbonos seriam direcionados para a matriz mitocondrial por meio do carreador de aspartato-glutamato (à direita). Abreviações: α -KG, α -cetoglutarato; 3-PG, 3-fosfoglicerato; AAT, aspartato aminotransferase; AGC, carreador de aspartato-glutamato; Glu, glutamato; LDH, lactato desidrogenase; Pi, fosfato inorgânico. Adaptado de Divakaruni et al., 2019. Figura elaborada no BioRender.

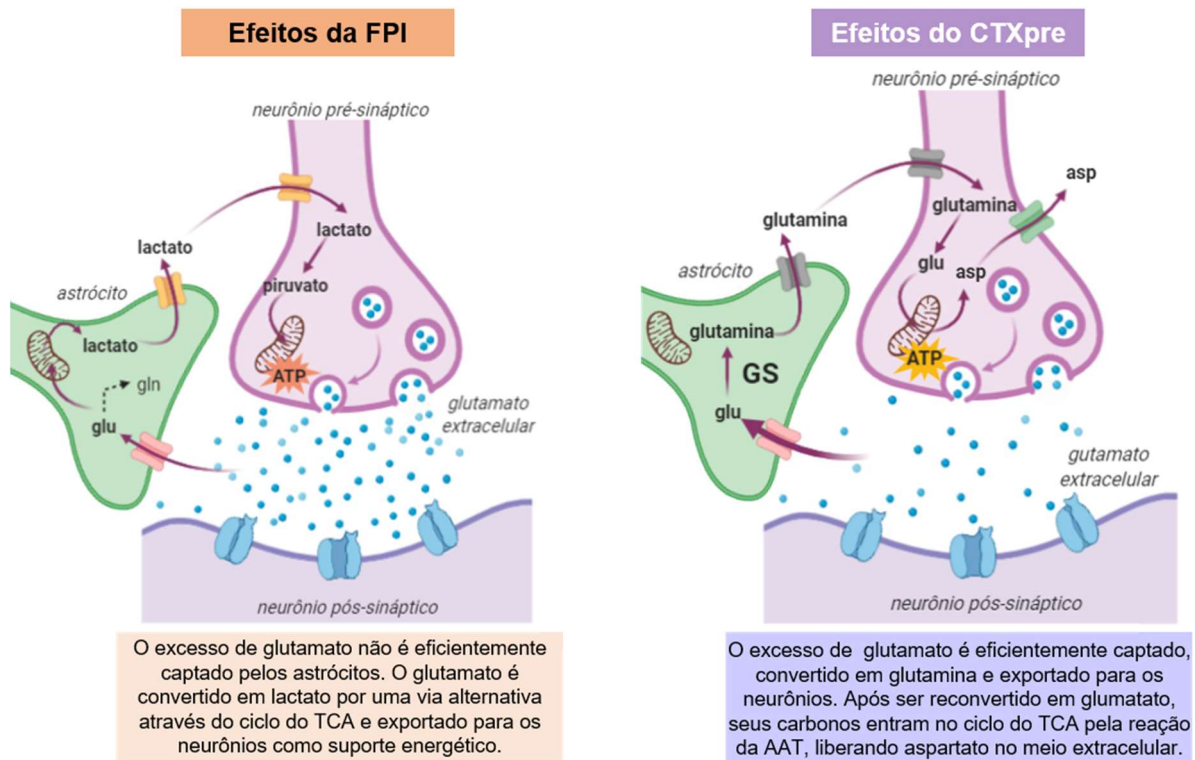


Figura 11. Resumo gráfico dos resultados obtidos no Capítulo 1 e 2 desta tese. À esquerda, a representação dos achados dos Capítulos 1 e 2 sobre as adaptações relacionadas à lesão por FPI na relação astrócito-neurônio (a divisão entre compartimentos celulares é fundamentada na literatura). A despolarização neuronal causada pela falha energética libera elevadas quantidades de aminoácidos excitatórios, dentre eles o glutamato, na fenda sináptica. Sua captação pelo astrócito está estimulada pela presença de substrato, mas comprometida pela diminuição da atividade da glutamina sintetase. Os astrócitos processam o glutamato por uma via alternativa do ciclo do TCA e exportam lactato aos neurônios como suporte energético. Tal adaptação parece ser um mecanismo endógeno adaptativo nas fases aguda e subaguda da lesão, mas que ainda assim exibe um prognóstico pobre na fase de recuperação do animal. À direita, a representação esquemática dos resultados obtidos no Capítulo 2 sobre a intervenção com o CTXpre. O CTXpre aumentou a atividade de captação de glutamato, sem afetar sua expressão. Seu efeito parece preservar a enzima glutamina sintetase e, assim, potencializa a captação de glutamato por facilitar sua remoção do meio intracelular. A glutamina é então liberada no ambiente extracelular para captação neuronal, onde é reconvertida a glutamato pela glutaminase, e submetida à oxidação pelo ciclo do TCA. Seu direcionamento para oxidação na mitocôndria pode estimular a liberação de aspartato para o meio extracelular. Abreviações: AAT, aspartato aminotransferase; Asp, aspartato; Glu, glutamato; Gln, glutamina; GS, glutamina sintetase. Fonte: a autora (Figura elaborada no BioRender).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1. Conclusões

Os resultados obtidos na presente tese nos levaram a concluir que:

- O cérebro como um todo é afetado pelo dano isquêmico focal, causando modulações principalmente através de expressão celular de proteínas, disponibilidade e utilização de substratos, bem como em parâmetros astrocitários;
- O aumento da atividade de captação de glutamato não é necessariamente acompanhado de aumento de expressão de seus transportadores, sugerindo uma regulação complexa que reflete a importância da remoção desse aminoácido da fenda sináptica para a homeostase cerebral;
- Mesmo em oclusão permanente, o metabolismo do glutamato está intimamente relacionado com o ciclo do TCA; no Capítulo 1, nossos resultados sugerem que seu catabolismo pode suprir energeticamente os neurônios pelo fornecimento de lactato, uma alteração que conectou ambos os hemisférios cerebrais na fase aguda da lesão; no Capítulo 2, vimos que seu desvio para oxidação otimizou o metabolismo celular, resultando em melhoria comportamental;
- O glutamato parece ser um aminoácido-chave para a reprogramação metabólica cerebral, uma vez que se localiza na interface entre consumo e gerenciamento energético – seu gerenciamento energético aparenta ser um alvo terapêutico promissor para a IT;
- A IC resultou em adaptações metabólicas dos processos celulares frente à crise energética; o CTXpre alterou a resposta cerebral à lesão isquêmica, sendo responsável por ativar vias metabólicas alternativas que otimizaram a produção e distribuição de substratos em condições de estresse metabólico;
- É possível que intervenções farmacológicas de PC dependam do cenário pós-IC (*i.e.*, com ou sem reperfusão) para manifestar alguns tipos de mecanismo, sendo necessários mais estudos para considerar quais os benefícios e riscos de sua administração;
- No nosso modelo experimental de oclusão permanente, os efeitos do PC demoraram mais para se tornarem evidentes na performance sensório-motora dos animais, sugerindo a necessidade de acompanhamentos a longo prazo para monitoração de mecanismos de recuperação e reparo cerebrais.

5.2. Perspectivas

Como perspectivas dos trabalhos que compõem a presente tese, podemos enumerar os seguintes:

- Avaliar o efeito do CTXpre nos complexos mitocondriais em Oroboros para verificar se esse fármaco influencia parâmetros mitocondriais;
- Avaliar se o CTXpre promoveu angiogênese por dosagem de VEGF e marcação de precursores de células endoteliais na região do peri-infarto;
- Avaliar a expressão de HIF-1 α no modelo de FPI de modo a acompanhar a possível influência desse fator nas alterações neuroquímicas encontradas;
- Realizar uma marcação imunohistoquímica com co-localização dos transportadores MCT e proteínas de citoesqueleto para verificar sua localização célula-específica;
- Avaliar o efeito do CTXpre sobre a reatividade astrocitária na região do peri-infarto para verificar a participação desse tipo celular nas alterações derivadas de um protocolo de PC;
- Avaliar o metabolismo in vivo por PET FDG após o CTXpre e a indução de IC por FPI, realizando também uma análise de redes metabólicas para investigar se houve otimização metabólica entre redes neurais;
- Avaliar a expressão de NF κ B após o CTXpre, bem como sua expressão pós-FPI.

6. ADENDOS

6.1. Carta de Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 31516

Título: ALTERAÇÕES A LONGO PRAZO INDUZIDAS POR UM MODELO IN VITRO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE NO METABOLISMO E MORFOLOGIA ASTROCITARIOS

Vigência: 01/07/2016 à 31/12/2016

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA - coordenador desde 01/07/2016

ANDRE QUINCOZES DOS SANTOS - pesquisador desde 01/07/2016

Leo Anderson Meira Martins - pesquisador desde 01/07/2016

Eduardo Rigón Zimmer - pesquisador desde 01/07/2016

Adriano Martimbianco de Assis - pesquisador desde 01/07/2016

YASMINE NONOSE - Aluno de Doutorado desde 01/07/2016

JUSSEMARA SOUZA DA SILVA - Aluno de Doutorado desde 01/07/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 341 ratos adultos machos, Wistar (90 dias de idade, entre 200 e 300g), criados e mantidos no biotério convencional em uma unidade do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 22 de Setembro de 2016

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA

Vice Coordenador da comissão de ética



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO


Número: 31516

Título: ALTERAÇÕES A LONGO PRAZO INDUZIDAS POR UM MODELO IN VIVO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE NO METABOLISMO E MORFOLOGIA ASTROCITÁRIOS

Pesquisador Responsável: DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Adendo ao Projeto de nº 31516 em reunião realizada em 30/09/2019 – Plenarinho – Anular Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 200 ratos Wistar machos de 60 dias de idade, provenientes do CREAL, e 50 ratos Wistar machos com idade de 1-2 dias provenientes do biotério setorial do departamento de Bioquímica da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em servidão de ensino ou pesquisa. Este documento revoga a Carta de Aprovação emitida anteriormente.

Porto Alegre, 11 de outubro de 2019.


Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Coordenador da CEUA/UFRGS

6.2. Comprovação de participação em outras publicações

- a) de Assis, AM; da Silva, JS; Rech, A; Longoni, A; **Nonose, Y**; Repond, C; de Bittencourt Pasquali, MA; Moreira, JC; Souza, DO; Pellerin, L. (2016) Cerebral ketone body oxidation is facilitated by a high fat diet enriched with advanced glycation end products in normal diabetic rats. DOI: 10.3389/fnins.2016.00509
- b) Longoni, A; Bellaver, B; Bobermin, LD; Santos, CL, **Nonose, Y**; Kolling, J; Dos Santos, TM; de Assis, AM; Quincozes-Santos, A; Wyse, ATS. (2018) Homocysteine induces glial reactivity in adult rat astrocyte cultures. DOI: 10.1007/s12035-017-0463-0
- c) Cittolin-Santos, GF; Guazzelli, PA; **Nonose, Y**; Almeida, RF; Fontella, FU; Pasquetti, MV; Ferreira-Lima, FJ; Lazzaroto, G; Berlezi, RM; Osvaldt, AB; Calcagnotto, ME; de Assis, AM; Souza, DO. (2019) Behavioral, neurochemical and brain oscillation abnormalities in an experimental model of acute liver failure. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.032
- d) Guazzelli, PA; Cittolin-Santos, GF; Meira-Martins, LA; Grigs, M; **Nonose, Y**; Lazzarotto, GS; Nogara, D; da Silva, JS; Fontella, FU; Wajner, M; Leipnitz, G; Souza, DO; de Assis, AM. (2020) Acute liver failure induces glial reactivity, oxidative stress and impairs brain energy metabolism in rats. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00327
- e) Da Silva, JS; **Nonose, Y**; Rohden, F; Lukasewicz Ferreira, PC; Fontella, FU; Rocha, A; Brochier, AW; Apel, RV; de Lima, TM; Seminotti, B; Amaral, AU; Galina, A; Souza, DO (2020) Guanosine Neuroprotection of Presynaptic Mitochondrial Calcium Homeostasis in a Mouse Study with Amyloid- β Oligomers. DOI: 10.1007/s12035-020-02064-4
- f) **Nonose, Y***; Pieper, LZ*; da Silva, JS; Longoni, A; Apel, RV; Meira-Martins, LA; Grings, M; Leipnitz, G; Souza, DO; de Assis, AM. (2020) Guanosine enhances glutamate uptake and oxidation, preventing oxidative stress in mouse hippocampal slices submitted to high glutamate levels. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.147080

* Both authors contributed equally to this work.

6.3. Instruções para autores da Revista Científica *Stroke*

Instruções podem ser encontradas em: <https://www.ahajournals.org/str/manuscript-preparation>

Manuscript Formatting

Only Microsoft Word files will be accepted for review. Manuscripts must be double-spaced, including references, figure legends, and tables. We recommend using Times New Roman 12-point font. Leave 1-inch margins on all sides. Number every page, beginning with the abstract page, including tables, figure legends, and figures.

Manuscripts should be presented in the following sequence:

- Title page
- Abstract
- NEW, May 2020: Abbreviations
- Text, including Introduction, Methods, Results, Discussion and Summary/Conclusions
- Acknowledgments
- Sources of Funding
- Conflict(s)-of-Interest/Disclosure(s)
- Updated May 2020: References
- Figure Legends
- Tables
- Figures
- Graphic Abstract
- Updated May 2020: Online Supplement

Cite each reference in the text in numerical order and list in the References section. In text, reference numbers may be repeated but not omitted. Do not duplicate references either in text or in the reference list.

Cite each figure and table in the text in numerical order.

Upload one copy of any in-press article that is cited in the references, if applicable.

Upload one copy of any abstracts published or submitted for publication, if applicable.

Use SI units of measure in all manuscripts. For example, molar (M) should be changed to mol/L; mg/dL to mmol/L; and cm to mm. Units of measure previously reported as percentages (e.g., hematocrit) are expressed as a decimal fraction. Measurements

currently not converted to SI units in biomedical applications are blood and oxygen pressures, enzyme activity, H⁺ concentration, temperature, and volume. The SI unit should be used in text, followed by the conventionally used measurement in parentheses. Conversions should be made by the author before the manuscript is submitted for peer review.

Provide \$US dollar equivalents if you include other currency amounts in the manuscript.

Please provide sex-specific and/or racial/ethnic-specific data, when appropriate, in describing outcomes of epidemiologic analyses or clinical trials; or specifically state that no sex-based or racial/ethnic-based differences were present. See the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals for more details.

Basic Science submissions: Authors are required to submit an online checklist requesting reporting of randomization procedures, blinding, a priori definition of inclusion and exclusion, etc. After selecting a Basic Science article type in the submission system, the form becomes available to complete as part of the submission process. If the manuscript is accepted, the form will be published as supplementary material. See Reporting Standards for Preclinical Studies of Stroke Therapy" (*Stroke*. 2016;47:2435-2438) for more information.

Please review the correct usage of the terms "sex" and "gender." "'Gender' refers to a person's self-representation...or how that person is responded to by social institutions on the basis of the person's gender presentation. 'Gender' is rooted in biology and shaped by environment and experience;" "sex" describes a class of "living things as male or female according to their reproductive organs and functions assigned by chromosomal complement" (AMA 10th ed. 2007: p 395). Please use the terms appropriately.

Confidence intervals should be reported instead of P values for estimated parameters, such as odds ratios and relative risks; P values should be reported only for relevant analytic tests. Authors are encouraged to avoid the pitfalls associated with the misuse of P values as measures of significance. Please refer to "The ASA's Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose." *The American Statistician*. 2016.70;2: 129-133. <http://dx.doi.org/10.1080/00031305.2016.1154108>.

Authorship Responsibility and Copyright Transfer Agreement Forms (and Licensing Agreements for Original Contributions) are ONLINE ONLY. Forms will be required PRIOR to resubmission, or if the manuscript has only one version (e.g., a letter to the editor) after acceptance. Each author will be sent an email containing a link to the form at the appropriate time.

Consult the AMA Manual of Style: A Guide for Authors and Editors, 10th ed, Oxford: Oxford University Press; 2007, for style.

Consult current issues for additional guidance on format.

Title Page

The first page of the manuscript should be the title page. This page must include:

- Full title of the article, limited to 120 characters.
- Authors' names, highest academic degree earned by each, authors' affiliations
- Name and complete address for the corresponding author, and address for reprints if different from address for correspondence. Please also include any study group or collaboration in the author list, i.e., “. . .Last Author, on behalf of the Stroke Study Group”
- Email address and telephone for the corresponding author.
- Cover title (total characters must not exceed 50, including spaces) to be typeset on the top of the journal page.
- Total number of tables and figures, e.g., Tables 2; Figures 3.
- 3 to 7 key words for use as indexing terms. Consider using terms found in the Medical Subject Headings (MeSH) database.
- Specify the number of words in the whole document on your title page, e.g., Word Count: 4896. Word count should include all parts of the manuscript (i.e., title page, abstract, text, acknowledgments, sources of funding, disclosures, references, figure legends, tables, and appendices intended for print publication). Over-length manuscripts will NOT be accepted for publication. See the Costs to Authors above.

Optional: *Stroke* posts about its published articles on Facebook and Twitter. If you would like us to include an author or department social media handle in our posts, please provide it on the title page.

Abstract

- Do not cite references in the abstract.
- Limit use of acronyms and abbreviations.
- Be concise (**300** words, maximum).
- December 2015: For authors following the PRISMA guideline, please use the journal abstract headings detailed below.
- The abstract should have the following headings:
 - Background and Purpose (description of rationale for study)
 - Methods (brief description of methods)
 - Results (presentation of significant results)
 - Conclusions (succinct statement of data interpretation)
- When applicable, include a fifth heading: “Clinical Trial Registration” Please list the URL, as well as the Unique Identifier, for the publicly accessible website on

which the trial is registered. If the trial is not registered, please indicate the reason in the heading.

- a) Example 1: Clinical Trial Registration-URL: <http://www.clinicaltrials.gov>. Unique identifier: NCT00123456.
- b) Example 2: Clinical Trial Registration-URL: <http://www.controlled-trials.com>. Unique identifier: ISRCTN70000879.
- c) Example 3: Clinical Trial Registration-URL: <http://www.chictr.org>. Unique identifier: ChiCTR-RCH-14004884.
- d) Example 4: Clinical Trial Registration-This trial was not registered because enrollment began prior to July 1, 2005.

New May 2020: Abbreviations

Please create a list of nonstandard abbreviations and nonstandard acronyms used in the manuscript text. The list should be included in the manuscript and placed after the abstract, before the Introduction. The list should be entitled “Non-standard Abbreviations and Acronyms.” Its content will not count toward the word limit. *Stroke* follows AMA style for standard and non-standard abbreviations and acronyms (<http://www.amamanualofstyle.com>). Abbreviations should only be used on words or phrases that are repeated more than 5 times in the article. All abbreviations and acronyms should be expanded upon first use in the text, and thereafter the abbreviation/acronym should be used.

Text

- The following are typical main headings: Materials and Methods, Results, Discussion, and Summary.
- Abbreviations must be defined at first mention in the text, tables, and figures.
- Introduction: This section should briefly introduce the context of the results to be presented and should not duplicate what is contained elsewhere in the manuscript

Methods:

Please ensure that your manuscript adheres to the AHA Journals' implementation of the Transparency and Openness Promotion (TOP) Guidelines (available online at <http://www.ahajournals.org/content/TOP-guidelines>). This means adding a sentence about data availability to the beginning of the Methods section.

- For any apparatuses used in Methods, the complete names of manufacturers must be supplied.
- For human subjects or patients, describe their characteristics.
- For animals used in experiments, state the species, strain, number used, and other pertinent descriptive characteristics.

- When describing surgical procedures on animals, identify the preanesthetic and anesthetic agents used, and state the amount or concentration and the route and frequency of administration for each. The use of paralytic agents, such as curare or succinylcholine, is not an acceptable substitute for anesthetics.
- For other invasive procedures on animals, report the analgesic or tranquilizing drugs used. If none were used, provide justification for such exclusion.
- Manuscripts that describe studies on humans must include a statement indicating if ethics approval was obtained from the local institutional review board and if written informed consent was obtained from patients or if the board waived the need for patient consent.
- Manuscripts involving animals must indicate that the study was approved by an institutional animal care and use committee.
- Reports of studies on both animals and humans must indicate that the procedures followed were in accordance with institutional guidelines.
- All drugs should be referred to by their generic names rather than trade names. The generic chemical identification of all investigational drugs must be provided.
- A statistical subsection must be provided at the end of the Methods section describing the statistical methodology employed for the data presented in the manuscript.
- The Methods section should provide essential information related to the conduct of the study presented in the manuscript. For methodology previously published by the authors, the prior publication should be referenced and a copy of the paper provided to the reviewers, if necessary.
- The Methods section should only contain material that is absolutely necessary for comprehension of the results section. Additional (more detailed) methods can be provided as a data supplement.
- Prevention of bias is important for experimental stroke research (see [Macleod et al, Stroke.2009;40:e50-e52](#)). For studies where the primary objective is the preclinical testing of therapies, the following checklist items must be adhered to and clearly documented in the manuscript:
 - Animals: Species, strains and sources must be defined. For genetically modified animals, wildtype controls including background and back-crossing must be defined.
 - Statistics and sample size: Specific statistical methods must be defined, including parametric versus nonparametric and multigroup analyses, and sample size powering based on expected variances and differences between groups.
 - Inclusions and exclusions: Specific criteria for inclusions and exclusions must be specified. For example, only animals where blood flow reductions fall below a certain threshold are included. Or only animals with a certain degree of neurological deficits are included. Once animals are randomized (see below), all excluded animals must be reported, including explicit presentation of mortality rates.

- Randomization, allocation concealment and blinding: All animals must be randomized. Investigators responsible for surgical procedures or drug treatments must be blinded. End point assessments must be performed by investigators blinded to the groups for which each animal is assigned.
- Any submitted meta-analyses should follow the PRISMA or MOOSE guidelines. The authors must clearly state in the Methods section which guideline was followed. If you use the PRISMA guidelines, please include a copy of the PRISMA checklist as a related manuscript file (not for publication) and include a flow diagram in your manuscript or supplemental data. The authors should use journal formatting for abstracts. Details on PRISMA guidelines can be found here <http://www.prisma-statement.org>. Details on MOOSE can be found via the [EQUATOR Network](#).

Results:

This section should succinctly report the results of experimental studies and clinical research or clinical series/observations.

Confidence intervals should be reported instead of P values for estimated parameters, such as odds ratios and relative risks; P values should be reported only for relevant analytic tests. Authors are encouraged to avoid the pitfalls associated with the misuse of P values as measures of significance. Please refer to "The ASA's Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose." *The American Statistician*. 2016.70;2: 129-133. <http://dx.doi.org/10.1080/00031305.2016.1154108>.

Discussion:

This section should not reiterate the results but put the results in appropriate context regarding relevant literature and the importance of new observations contained in the manuscript.

Summary/Conclusions:

A brief paragraph summarizing the results and their importance may be included but is not required.

Acknowledgments

The acknowledgments section lists all substantive contributions of individuals. Author contributions may be listed in the Acknowledgments section. Authors should obtain written, signed permission from all *non-author* individuals listed in the "Acknowledgments" section of the manuscript, because readers may infer their endorsement of data and conclusions. These permissions must be provided to the Editorial Office. Please see the [Acknowledgment Permission Form](#). The corresponding author must mark the following statement on the ONLINE ONLY Copyright Transfer Agreement form or Licensing Agreement, certifying that (1) all persons who have made substantial contributions in the manuscript (e.g., data collection, analysis, or writing or editing assistance), but who do not fulfill authorship criteria, are named with their

specific contributions in the Acknowledgments section of the manuscript; (2) all persons named in the Acknowledgments section have provided the corresponding author with written permission to be named in the manuscript; and (3) if an Acknowledgments section is not included, no other persons have made substantial contributions to this manuscript.

Sources of Funding

Authors must list all sources of research support relevant to the manuscript in this location. All grant funding agency abbreviations should be completely spelled out, with the exception of the NIH. Note that funding should be listed separately from disclosures.

Disclosures

Authors must state disclosures in the manuscript text prior to first review and provide disclosures online when submitting a revision or upon request after acceptance. Disclosures stated in the text must match the online disclosures. If you have no disclosures, please state “Disclosures: None” in the manuscript text before the references. Conflicts of interest pertain to relationships with pharmaceutical companies, biomedical device manufacturers, or other corporations whose products or services are related to the subject matter of the article. Such relationships include, but are not limited to, employment by an industrial concern, ownership of stock, membership on a standing advisory council or committee, being on the board of directors, or being publicly associated with the company or its products. Other areas of real or perceived conflict of interest could include receiving honoraria or consulting fees or receiving grants or funds from such corporations or individuals representing such corporations. The corresponding author should collect Conflict of Interest information from all co-authors before submitting a manuscript online.

Updated May 2020: References

- Accuracy of reference data is the author’s responsibility. Verify all entries against original sources, especially journal titles, inclusive page numbers, publication dates, accents, diacritical marks, and spelling in languages other than English.
- Do not list the month/issue/day (the number in parentheses) in the reference.
- **Updated May 2020:** References with more than 10 authors should list the first 10 authors followed by et al.
- Cite references in numerical order according to first mention in text.
- Personal communications, unpublished observations, and submitted manuscripts must be cited in the text, not in the references, as “([name(s)], unpublished data, 2017)”
- References must be from a full-length publication in a peer-reviewed journal.
- Abstracts may be cited only if they are the sole source and must be identified in the references as “Abstract”

- “In-press” citations must have been accepted for publication and the name of the journal or book publisher included. Please provide a copy of any potentially overlapping manuscript that has been submitted to another journal or is in press or published elsewhere.

Example References:

Print journal reference: Mistry EA, Mistry AM, Nakawah MO, Chitale RV, James RF, Volpi JJ, Fusco MR. Mechanical Thrombectomy Outcomes With and Without Intravenous Thrombolysis in Stroke Patients: A Meta-Analysis. *Stroke*. 2017;48:2450-2456.

Online journal references: Wu X, Lin L, Qin J-J, Wang L, Wang H, Zou Y, Zhu X, Hong Y, Zhang Y, Liu Y, et al. CARD3 Promotes Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Via Activation of TAK1. *J Am Heart Assoc*. 2020;9:e014920.

Li J, Liu J, Liu M, Zhang S, Hao Z, Zhang J, Zhang C. Closure versus medical therapy for preventing recurrent stroke in patients with patent foramen ovale and a history of cryptogenic stroke or transient ischemic attack. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 9: CD009938.

Publish-Ahead-of-Print reference: Yaghi S, Ishida K, Torres J, Mac Groy B, Raz E, Humbert K, Henninger N, Trivedi T, Lillemoe K, Alam S, et al. SARS2-CoV-2 and Stroke in a New York Healthcare System. [published online May 20, 2020]. *Stroke*. 2020.

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.120.030335>. Accessed May 21, 2020.

Book reference: Schermerhorn ML et al. Carotid Artery Stenting. Fischer JE, Bland KI, Callery MP, eds. In: *Mastery of Surgery*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Website reference: Stroke Death Rates, Hispanics Age 65+. Quick Maps of Heart Disease and Stroke. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Division for Heart Disease and Stroke Prevention. https://www.cdc.gov/dhdsp/maps/national_maps/stroke65_hispanics.htm. Accessed July 26, 2019.

Web sites generally follow this format: Author names (if any). Title of information or page. Name of website. URL. Publication date (if any). Access date.

Software reference: StataCorp. Stata statistical software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP; 2011.

Conference Proceeding: Author(s) Name(s). Title of Paper/Poster. Paper/Poster presented at: Name of Conference; Month Dates, Year; City, State. URL [link]. Accessed Month Day, Year.

Government bulletin: Author. Title of bulletin. Place of publication: Name of issuing department or agency; publication date. Page numbers (if any). Publication number (if any). Series number (if any).

Database reference: CANCERNET-PDQ [database online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1996. Updated March 29, 1996.

Figure Legends

Provide figure legends on a separate page of the manuscript.

Permission is required for all images that are reused or adapted from another source. To obtain permission, please follow the instructions provided by the copyright holder or listed in the license agreement. This includes Creative Commons material; please refer to <http://creativecommons.org/licenses> for more information about properly crediting Creative Commons sources. Follow the copyright holder or licensor's requirements for credit attributions and provide them in the figure legend. If no language is provided in the permission letter, use the following sample: Reprinted from Lin et al,¹⁹ with permission from Science Publishing. Copyright 2016, American Science Society.

Tables

- Each table must be typed on a separate sheet and double-spaced, if possible. The table number should be Arabic, followed by a period and a brief informative title.
- Use the same size type as in text.
- Tables should be cell-based (i.e., constructed using Microsoft Word tables or Excel). Do not use tabs or hard returns. Do not supply tables as graphics.
- Tables should be used to present comparisons of large amounts of data at a glance. Tables with only 1 or 2 rows of data should be incorporated into the text.
- Tables should be as compact as possible. Avoid unnecessary rows and columns.
- Use indenting within the stub column to indicate subgroups. Do not use bold, shading, rules, etc.
- Tables should not contain vertically merged cells; horizontally merged cells are permitted when necessary in the heading row.
- Internal headings are not permitted outside of the stub column. If internal headings are required, the table should be split into 2 tables.
- No internal shading is permitted.
- Units of measure should be in the heading row or stub column rather than the body of the table whenever possible.
- Indicate footnotes in the table in this order: *, †, ‡, §, ||, #, * *. Follow AMA 9th edition for footnote styles.
- Permission is required for all tables that are reused or adapted from another source. To obtain permission, please follow the instructions provided by the

copyright holder or listed in the license agreement. Follow the copyright holder or licensor's requirements for credit attributions and provide them in the table footnote. If no language is provided in the permission letter, use the following sample: Reprinted from Roberts et al,¹⁴ with permission from Smith Publishing. Copyright 2015, American Society of Medical Research.

Figures

- The combined total number of figures and tables is limited to 6 (3 for Brief Reports). Each figure may contain up to 4 panels (i.e., parts A to D) and must conform to the requirements for figures described below.
- Authors should be pleased with the figure submission quality before submission. We recommend that you print the figure at its final publication size to check the quality.
- Figures should be submitted as high-resolution TIFF or EPS files. PowerPoint files are discouraged because elements within the figure (such as axis labels) may shift location or drop out during conversion. Further, do not create figures in Powerpoint because even if you convert to a different file type, the resolution will be too low for publication. JPEG, Word, PPT, and Excel files should not be used. See (PDF) for instructions for creating high-quality digital art.
- Figures should be supplied at the highest resolution possible for optimal clarity. Color figures should be at least 300 dpi; halftones, 600 dpi; and line art, 1200 dpi.
- Figures should be submitted at the final publication size. Please note that most figures will be sized at 1 column wide. Dimensions for figures are:
 - a) 1 column: 3.25 inches wide (8 cm or 19.5 picas)
 - b) 2 columns: 6.80 inches wide (17.272 cm or 40.8 picas)
- Color figures should be in RGB (red/green/blue) mode. If a figure is supplied in CMYK (cyan/magenta/yellow/black) mode, there may be a shift in the appearance of colors, especially fluorescents. Figures that will appear in black and white should be submitted in black and white.
- For line and bar graphs and pie charts, ensure that the colors/lines/symbols used for the different sets of data are easily distinguishable. Hair lines are hard to reproduce as are lines that are too thick, as they may make it hard to distinguish between the coordinates.
- Graphs and charts should have a white background.
- Labels for panels should be uppercase letters (A, B, C, D) in boldface Arial or Helvetica.
- Multipart figures may have no more than 4 panels (i.e., A, B, C, D).
- Multipart figures may be set at 2 columns across the page and should be laid out horizontally if appropriate.

- Use the same font (typeface) throughout the figure. Sans serif fonts, such as Arial and Helvetica, work best.
- Use the largest font size possible without distorting the figures. Text for super- or subscripts should be no smaller than 6 points.
- Whenever possible, all text within a figure should be the same size. If this is not possible, the font size should vary by no more than 2 points.
- Label units of measure consistently with the text and legend. Follow the AMA for unit abbreviations.
- Incorporate figure keys into the legend rather than including them as part of the figure whenever possible.
- Avoid heading/Title on the figure. Title information should be included in the figure legends.
- Any abbreviations or symbols used in the figures must be defined in the figure or figure legend.
- Follow AMA 9th edition for footnote style in legends.
- If the figure is reprinted/adapted from another source, please provide a permission letter and include the source in the legend as noted above.
- Supply a scale bar with photomicrographs.
- Authors are responsible for the cost of printing color illustrations. Authors are also responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce previously published artwork.
- See AMA, 10th edition, Section 4.2 for more information on figures.

Graphic Abstract

Updated June 2020: The intent of the graphic abstract is to provide readers with a succinct summary of the study in a form that facilitates its dissemination in presentations. It can be submitted at any time, but is an absolute requirement for revision submissions of Basic and Translational Science submissions and optional for Clinical and Population Science submissions.

- A single figure panel/diagram/cartoon.
- **Emphasize the new findings in the paper and clinical implications.**
- Size: The submitted document should be no larger than 18 cm (7 inches) square.
- Font: Prefer a sans serif font that is no less than 12 point. Use the largest font size possible without distorting the figure.
- Updated June 2020: A legend of no more than 50-100 words is optional.
- Do not include tabular items; all content should be graphical.
- Please upload as Supplemental Material as a JPG file format. This is separate from the single Supplemental PDF containing additional manuscript content noted below.

Supplemental Material

- This optional section provides an opportunity for authors to present supporting materials to the manuscript. The manuscript appears both in the print version and online, whereas Supplemental material are independent from the manuscript and appear only online in the format submitted by the authors. Supplemental material undergoes peer review and must be submitted simultaneously with original submissions.
- Any collaborators who need to be cross-referenced in PubMed should be listed either as authors or, for study groups, in the main manuscript file as an Appendix. This information is included in the word count. If contributors do not need to be listed as authors or cross-referenced in PubMed, then they may be included in a PDF Supplemental Material File.
- The guidelines below should be used for supplemental material:
- Material to be published as an online only supplement should be uploaded online as a single PDF. An exception to this would be if the online supplement is a video file (.mov, .AVI, .mp4, .m4v, .mp4v) or an Excel file that contains too much material (e.g., hundreds of rows and columns that cross multiple pages) to convert to PDF and still be easily readable.
- The supplemental material should have a title page with the label of SUPPLEMENTAL MATERIAL above the title. The supplemental material to be included in this PDF is as follows: Supplemental Methods, Supplemental Tables, Supplemental Figures and Figure Legends, and Supplemental References. If applicable, the legends for the Video files should also be included in this PDF.
- The supplement should be single-spaced.

NEW May 2020: Supplementary Materials should NOT include a separate reference list and all citations in the Supplemental Materials should be included in the main reference list.

In the manuscript text, following the Acknowledgments, Sources of Funding, & Disclosures section, please include a list of the supplemental materials with a callout to any references that are in the Supplemental Material only, for example:

- a) Supplemental Materials
 - b) Expanded Materials & Methods
 - c) Online Figures I – IV
 - d) Online Video I
 - e) Data Set
 - f) References 34-39
- Number supplementary figures and tables as Figure I, Figure II, Table I, Table II, etc.
 - Place the supplemental figure legend underneath the corresponding figure.

- When referring to online-only material in the print version of the manuscript, use the phrase “please see <https://www.ahajournals.org/journal/str>”
- Supplemental Material appears only online and will not appear in reprints of the article. The Editorial Office is not responsible for converting files to PDF.

7. REFERÊNCIAS

- Abbott, N J, L Ronnback, and E Hansson. 2006. "Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier." *Nat Rev Neurosci* 7 (1): 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>.
- Alle, H, A Roth, and J R Geiger. 2009. "Energy-Efficient Action Potentials in Hippocampal Mossy Fibers." *Science* 325 (5946): 1405–8. <https://doi.org/10.1126/science.1174331>.
- Altas, M, S Meydan, M Aras, N Yilmaz, K T Ulutas, H M Okuyan, and A Nacar. 2013. "Effects of Ceftriaxone on Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Brain." *J Clin Neurosci* 20 (3): 457–61. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.05.030>.
- Altman, F P. 1976. "Tetrazolium Salts and Formazans." *Prog Histochem Cytochem* 9 (3): 1–56.
- American Stroke Association, 2012. 2012. "Types of Stroke." Disponível em: http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/TypesofStroke/Types-of-Stroke_UCM_308531_SubHomePage.jsp. 2012.
- Anderson, C M, and R A Swanson. 2000. "Astrocyte Glutamate Transport: Review of Properties, Regulation, and Physiological Functions." *Glia* 32 (1): 1–14.
- Aragones, J, M Schneider, K Van Geyte, P Fraisl, T Dresselaers, M Mazzone, R Dirx, et al. 2008. "Deficiency or Inhibition of Oxygen Sensor Phd1 Induces Hypoxia Tolerance by Reprogramming Basal Metabolism." *Nat Genet* 40 (2): 170–80. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.62>.
- Astrup, J, B K Siesjo, and L Symon. 1981. "Thresholds in Cerebral Ischemia - the Ischemic Penumbra." *Stroke* 12 (6): 723–25.
- Bak, Lasse K, Helle S Waagepetersen, Michael Sørensen, Peter Ott, Hendrik Vilstrup, Susanne Keiding, and Arne Schousboe. 2013. "Role of Branched Chain Amino Acids in Cerebral Ammonia Homeostasis Related to Hepatic Encephalopathy." *Metabolic Brain Disease* 28 (2): 209–15. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9381-7>.
- Balkaya, Mustafa, Jan M Kröber, Andre Rex, and Matthias Endres. 2013. "Assessing Post-Stroke Behavior in Mouse Models of Focal Ischemia." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (3): 330–38. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.185>.
- Barone, F C, B Arvin, R F White, A Miller, C L Webb, R N Willette, P G Lysko, and G Z Feuerstein. 1997. "Tumor Necrosis Factor-Alpha. A Mediator of Focal Ischemic Brain Injury." *Stroke* 28 (6): 1233–44. <https://doi.org/10.1161/01.str.28.6.1233>.
- Baud, O, L Fayol, P Gressens, L Pellerin, P Magistretti, P Evrard, and C Verney. 2003. "Perinatal and Early Postnatal Changes in the Expression of Monocarboxylate Transporters MCT1 and MCT2 in the Rat Forebrain." *J Comp Neurol* 465 (3): 445–54. <https://doi.org/10.1002/cne.10853>.
- Becerra-Calixto, Andrea, and Gloria P Cardona-Gómez. 2017. "The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 88. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00088>.
- Belanger, M, I Allaman, and P J Magistretti. 2011. "Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation." *Cell Metab* 14 (6): 724–38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>.
- Bergersen, L H. 2015. "Lactate Transport and Signaling in the Brain: Potential Therapeutic Targets and Roles in Body-Brain Interaction." *J Cereb Blood Flow Metab* 35 (2): 176–85. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.206>.
- Berthet, C, X Castillo, P J Magistretti, and L Hirt. 2012. "New Evidence of Neuroprotection by Lactate after Transient Focal Cerebral Ischaemia: Extended Benefit after Intracerebroventricular Injection and Efficacy of Intravenous Administration." *Cerebrovasc Dis* 34 (5–6): 329–35. <https://doi.org/10.1159/000343657>.
- Bhuiyan, M I, and Y J Kim. 2010. "Mechanisms and Prospects of Ischemic Tolerance Induced by Cerebral Preconditioning." *Int Neurorol J* 14 (4): 203–12. <https://doi.org/10.5213/inj.2010.14.4.203>.
- Bogousslavsky, J, G Van Melle, and F Regli. 1988. "The Lausanne Stroke Registry: Analysis of 1,000 Consecutive Patients with First Stroke." *Stroke* 19 (9): 1083–92.
- Bonaventura, Aldo, Luca Liberale, Alessandra Vecchié, Matteo Casula, Federico Carbone, Franco Dallegri, and Fabrizio Montecucco. 2016. "Update on Inflammatory Biomarkers and Treatments in Ischemic Stroke." *International Journal of Molecular Sciences* . <https://doi.org/10.3390/ijms17121967>.
- Bonde, C, A Sarup, A Schousboe, G Gegelashvili, J Zimmer, and J Noraberg. 2003. "Neurotoxic and Neuroprotective Effects of the Glutamate Transporter Inhibitor DL-Threo-Beta-Benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during Physiological and Ischemia-like Conditions." *Neurochem Int* 43 (4–5): 371–80.
- Boston-Howes, William, Stuart L Gibb, Eric O Williams, Piera Pasinelli, Robert H Jr Brown, and Davide Trotti. 2006. "Caspase-3 Cleaves and Inactivates the Glutamate Transporter EAAT2." *The*

- Journal of Biological Chemistry* 281 (20): 14076–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600653200>.
- Botelho, de Araújo; de Assis; Machado Neto. 2016. "Epidemiologia Do Acidente Vascular Cerebral No Brasil." *Temas Em Saúde* 16 (2): 16.
- Boumezbeur, F, G F Mason, R A de Graaf, K L Behar, G W Cline, G I Shulman, D L Rothman, and K F Petersen. 2010. "Altered Brain Mitochondrial Metabolism in Healthy Aging as Assessed by in Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy." *J Cereb Blood Flow Metab* 30 (1): 211–21. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.197>.
- Bouzier-Sore, A K, and L Pellerin. 2013. "Unraveling the Complex Metabolic Nature of Astrocytes." *Front Cell Neurosci* 7: 179. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00179>.
- Bouzier-Sore, A K, P Voisin, V Bouchaud, E Bezancon, J M Franconi, and L Pellerin. 2006. "Competition between Glucose and Lactate as Oxidative Energy Substrates in Both Neurons and Astrocytes: A Comparative NMR Study." *Eur J Neurosci* 24 (6): 1687–94. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05056.x>.
- Bouzier-Sore, A K, P Voisin, P Canioni, P J Magistretti, and L Pellerin. 2003. "Lactate Is a Preferential Oxidative Energy Substrate over Glucose for Neurons in Culture." *J Cereb Blood Flow Metab* 23 (11): 1298–1306. <https://doi.org/10.1097/01.wcb.0000091761.61714.25>.
- Bramham, Clive R, and Elhoucine Messaoudi. 2005. "BDNF Function in Adult Synaptic Plasticity: The Synaptic Consolidation Hypothesis." *Progress in Neurobiology* 76 (2): 99–125. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.003>.
- Broughton, B R, D C Reutens, and C G Sobey. 2009. "Apoptotic Mechanisms after Cerebral Ischemia." *Stroke* 40 (5): e331-9. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.108.531632>.
- Brouns, R, and P P De Deyn. 2009. "The Complexity of Neurobiological Processes in Acute Ischemic Stroke." *Clin Neurol Neurosurg* 111 (6): 483–95. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2009.04.001>.
- Bruce, A J, W Boling, M S Kindy, J Peschon, P J Kraemer, M K Carpenter, F W Holtzman, and M P Mattson. 1996. "Altered Neuronal and Microglial Responses to Excitotoxic and Ischemic Brain Injury in Mice Lacking TNF Receptors." *Nat Med* 2 (7): 788–94.
- Buffo, A, C Rolando, and S Ceruti. 2010. "Astrocytes in the Damaged Brain: Molecular and Cellular Insights into Their Reactive Response and Healing Potential." *Biochem Pharmacol* 79 (2): 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.09.014>.
- Buttini, M, A Sauter, and H W Boddeke. 1994. "Induction of Interleukin-1 Beta mRNA after Focal Cerebral Ischaemia in the Rat." *Brain Research. Molecular Brain Research* 23 (1–2): 126–34. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90218-6).
- Calabresi, P, D Centonze, and G Bernardi. 2000. "Cellular Factors Controlling Neuronal Vulnerability in the Brain: A Lesson from the Striatum." *Neurology* 55 (9): 1249–55.
- Camandola, S, and M P Mattson. 2017. "Brain Metabolism in Health, Aging, and Neurodegeneration." *Embo J* 36 (11): 1474–92. <https://doi.org/10.15252/embj.201695810>.
- Carmichael, S T. 2015. "The 3 Rs of Stroke Biology: Radial, Relayed, and Regenerative." *Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0408-0>.
- Carmignoto, G, and M Gomez-Gonzalo. 2010. "The Contribution of Astrocyte Signalling to Neurovascular Coupling." *Brain Res Rev* 63 (1–2): 138–48. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.007>.
- Carter, Alex R, Serguei V Astafiev, Catherine E Lang, Lisa T Connor, Jennifer Rengachary, Michael J Strube, Daniel L W Pope, Gordon L Shulman, and Maurizio Corbetta. 2010. "Resting Interhemispheric Functional Magnetic Resonance Imaging Connectivity Predicts Performance after Stroke." *Annals of Neurology* 67 (3): 365–75. <https://doi.org/10.1002/ana.21905>.
- Cekanaviciute, Egle, and Marion S Buckwalter. 2016. "Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases." *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 13 (4): 685–701. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0477-8>.
- Cheng, Yu Dennis, Lama Al-Khoury, and Justin A Zivin. 2004. "Neuroprotection for Ischemic Stroke: Two Decades of Success and Failure." *NeuroRx* 1 (1): 36–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC534911/>.
- Chollet, F, V DiPiero, R J Wise, D J Brooks, R J Dolan, and R S Frackowiak. 1991. "The Functional Anatomy of Motor Recovery after Stroke in Humans: A Study with Positron Emission Tomography." *Ann Neurol* 29 (1): 63–71. <https://doi.org/10.1002/ana.410290112>.
- Chu, K, S T Lee, D I Sinn, S Y Ko, E H Kim, J M Kim, S J Kim, et al. 2007. "Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation." *Stroke* 38 (1): 177–82. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000252091.36912.65>.
- Cunnane, Stephen, Scott Nugent, Maggie Roy, Alexandre Courchesne-Loyer, Etienne Croteau, Sébastien Tremblay, Alex Castellano, et al. 2011. "Brain Fuel Metabolism, Aging, and

- Alzheimer's Disease." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 27 (1): 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.021>.
- Daikhin, Y, and M Yudkoff. 2000. "Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glia." *J Nutr* 130 (4S Suppl): 1026s-31s. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1026S>.
- Danbolt, N C. 2001. "Glutamate Uptake." *Prog Neurobiol* 65 (1): 1–105.
- Davies, C A, S A Loddick, S Toulmond, R P Stroemer, J Hunt, and N J Rothwell. 1999. "The Progression and Topographic Distribution of Interleukin-1beta Expression after Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19 (1): 87–98. <https://doi.org/10.1097/00004647-199901000-00010>.
- Deitmer, Joachim W, Shefeeq M Theparambil, Ivan Ruminot, Sina I Noor, and Holger M Becker. 2019. "Energy Dynamics in the Brain: Contributions of Astrocytes to Metabolism and PH Homeostasis ." *Frontiers in Neuroscience* . <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.01301>.
- Demaerschalk, B M, H M Hwang, and G Leung. 2010. "US Cost Burden of Ischemic Stroke: A Systematic Literature Review." *Am J Manag Care* 16 (7): 525–33.
- Demetrius, Lloyd A, Pierre J Magistretti, and Luc Pellerin. 2015. "Alzheimer's Disease: The Amyloid Hypothesis and the Inverse Warburg Effect ." *Frontiers in Physiology* . <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00522>.
- Dienel, G A, and L Hertz. 2005. "Astrocytic Contributions to Bioenergetics of Cerebral Ischemia." *Glia* 50 (4): 362–88. <https://doi.org/10.1002/glia.20157>.
- Dimmer, K S, B Friedrich, F Lang, J W Deitmer, and S Broer. 2000. "The Low-Affinity Monocarboxylate Transporter MCT4 Is Adapted to the Export of Lactate in Highly Glycolytic Cells." *Biochem J* 350 Pt 1: 219–27.
- Dirnagl, U, K Becker, and A Meisel. 2009. "Preconditioning and Tolerance against Cerebral Ischaemia: From Experimental Strategies to Clinical Use." *Lancet Neurol* 8 (4): 398–412. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(09\)70054-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(09)70054-7).
- Dirnagl, U, C Iadecola, and M A Moskowitz. 1999. "Pathobiology of Ischaemic Stroke: An Integrated View." *Trends Neurosci* 22 (9): 391–97.
- Dirnagl, Ulrich, and Malcolm R Macleod. 2009. "Stroke Research at a Road Block: The Streets from Adversity Should Be Paved with Meta-Analysis and Good Laboratory Practice." *Br J Pharmacol* 157 (7): 1154–56. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00211.x>.
- Divakaruni, A S, M Wallace, C Buren, K Martyniuk, A Y Andreyev, E Li, J A Fields, et al. 2017. "Inhibition of the Mitochondrial Pyruvate Carrier Protects from Excitotoxic Neuronal Death" 216 (4): 1091–1105. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612067>.
- Donnan, Geoffrey A, Stephen M Davis, and Frank R Sharp. 2007. "The Ischemic Penumbra: Pathophysiology, Imaging and Therapy." Edited by Informa Healthcare. *Neurological Disease and Therapy*.
- Dugan, L L, and D W Choi. 1999. "Hypoxia-Ischemia and Brain Infarction." In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, edited by Siegel GJ, Agranoff BW, and Alberts RW. Vol. 6th editio. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Engelhardt, Elias. 2017. "Apoplexy, Cerebrovascular Disease, and Stroke: Historical Evolution of Terms and Definitions." *Dementia & Neuropsychologia* 11: 449–53. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-57642017000400449&nrm=iso.
- Escartin, C, O Guillemaud, and M A Carrillo-de Sauvage. 2019. "Questions and (Some) Answers on Reactive Astrocytes" 67 (12): 2221–47. <https://doi.org/10.1002/glia.23687>.
- Felmlee, Melanie A, Robert S Jones, Vivian Rodriguez-Cruz, Kristin E Follman, and Marilyn E Morris. 2020. "Monocarboxylate Transporters (SLC16): Function, Regulation, and Role in Health and Disease." *Pharmacological Reviews* 72 (2): 466–85. <https://doi.org/10.1124/pr.119.018762>.
- Fluri, F, M K Schuhmann, and C Kleinschnitz. 2015. "Animal Models of Ischemic Stroke and Their Application in Clinical Research." *Drug Des Devel Ther* 9: 3445–54. <https://doi.org/10.2147/dddt.s56071>.
- Fonnum, F. 1984. "Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain." *J Neurochem* 42 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb09689.x>.
- Frigerio, Francesca, Marina Casimir, Stefania Carobbio, and Pierre Maechler. 2008. "Tissue Specificity of Mitochondrial Glutamate Pathways and the Control of Metabolic Homeostasis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1777 (7–8): 965–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.031>.
- Fukuda, R, H Zhang, J W Kim, L Shimoda, C V Dang, and G L Semenza. 2007. "HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells." *Cell* 129 (1): 111–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.047>.
- Fukumoto, Dai, Teruyo Hosoya, Shingo Nishiyama, Norihiro Harada, Hiroshi Iwata, Shigeyuki

- Yamamoto, and Hideo Tsukada. 2011. "Multiparametric Assessment of Acute and Subacute Ischemic Neuronal Damage: A Small Animal Positron Emission Tomography Study with Rat Photochemically Induced Thrombosis Model." *Synapse (New York, N.Y.)* 65 (3): 207–14. <https://doi.org/10.1002/syn.20836>.
- Garcia, J H. 1984. "Experimental Ischemic Stroke: A Review." *Stroke* 15 (1): 5–14. <https://doi.org/10.1161/01.str.15.1.5>.
- Garcia, J H, S Wagner, K F Liu, and X J Hu. 1995. "Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. Statistical Validation." *Stroke* 26 (4): 627–34; discussion 635.
- Geng, J, Y Zhang, S Li, S Li, J Wang, H Wang, J Aa, and G Wang. 2018. "Metabolomic Profiling Reveals That Reprogramming of Cerebral Glucose Metabolism Is Involved in Ischemic Preconditioning-Induced Neuroprotection in a Rodent Model of Ischemic Stroke." <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00339>.
- Gibson, G E, C Peterson, and J Sansone. 1981. "Decreases in Amino Acids and Acetylcholine Metabolism during Hypoxia." *J Neurochem* 37 (1): 192–201. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb05308.x>.
- Giddy, J M. 2006. "Cerebral Preconditioning and Ischaemic Tolerance." *Nat Rev Neurosci* 7 (6): 437–48. <https://doi.org/10.1038/nrn1927>.
- Gordon, G R, S J Mulligan, and B A MacVicar. 2007. "Astrocyte Control of the Cerebrovasculature." *Glia* 55 (12): 1214–21. <https://doi.org/10.1002/glia.20543>.
- Had-Aissouni, L. 2012. "Toward a New Role for Plasma Membrane Sodium-Dependent Glutamate Transporters of Astrocytes: Maintenance of Antioxidant Defenses beyond Extracellular Glutamate Clearance." *Amino Acids* 42 (1): 181–97. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0863-9>.
- Halestrap, A P. 2013. "The SLC16 Gene Family - Structure, Role and Regulation in Health and Disease." *Mol Aspects Med* 34 (2–3): 337–49. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.003>.
- Halestrap, Andrew P., and Marieangela C. Wilson. 2012. "The Monocarboxylate Transporter Family- Role and Regulation." *IUBMB Life* 64 (2): 109–19. <https://doi.org/10.1002/iub.572>.
- Hammond, Rebecca S, Laura E Tull, and Robert W Stackman. 2004. "On the Delay-Dependent Involvement of the Hippocampus in Object Recognition Memory." *Neurobiology of Learning and Memory* 82 (1): 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005>.
- Han, Feng, Norifumi Shioda, Shigeki Moriguchi, Zheng-Hong Qin, and Kohji Fukunaga. 2008. "Downregulation of Glutamate Transporters Is Associated with Elevation in Extracellular Glutamate Concentration Following Rat Microsphere Embolism." *Neuroscience Letters* 430 (3): 275–80. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.021>.
- Hansel, G, A C Tonon, F L Guella, L F Pettenuzzo, T Duarte, M M Duarte, J P Oses, M Achaval, and D O Souza. 2015. "Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response." *Mol Neurobiol* 52 (3): 1791–1803. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8978-0>.
- Hansel, Gisele. 2014. "Efeitos Neuroprotetores Da Guanosina e Da Inosina Frente Às Ações Neurotóxicas Da Isquemia Cerebral in Vivo." *Biochemistry Department. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS*.
- Hatem, Samar M, Geoffroy Saussez, Margaux Della Faille, Vincent Prist, Xue Zhang, Delphine Dispa, and Yannick Bleyenheuft. 2016. "Rehabilitation of Motor Function after Stroke: A Multiple Systematic Review Focused on Techniques to Stimulate Upper Extremity Recovery." *Frontiers in Human Neuroscience* 10: 442. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00442>.
- Hayakawa, K, T Nakano, K Irie, S Higuchi, M Fujioka, K Orito, K Iwasaki, et al. 2010. "Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Retards Neurovascular Remodeling and Recovery after Focal Cerebral Ischemia in Mice." *J Cereb Blood Flow Metab* 30 (4): 871–82. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.257>.
- Heneka, M T, J J Rodriguez, and A Verkhratsky. 2010. "Neuroglia in Neurodegeneration." *Brain Res Rev* 63 (1–2): 189–211. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.004>.
- Hertz, Leif, and Ye Chen. 2017. "Integration between Glycolysis and Glutamate-Glutamine Cycle Flux May Explain Preferential Glycolytic Increase during Brain Activation, Requiring Glutamate." *Frontiers in Integrative Neuroscience* 11: 18. <https://doi.org/10.3389/fnint.2017.00018>.
- Hirayama, Y, and S Koizumi. 2018. "Astrocytes and Ischemic Tolerance." *Neurosci Res* 126: 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.013>.
- Höglund, Erik, Øyvind Øverli, and Svante Winberg. 2019. "Tryptophan Metabolic Pathways and Brain Serotonergic Activity: A Comparative Review ." *Frontiers in Endocrinology* . <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00158>.
- Horikawa, Y, S Naruse, K Hirakawa, C Tanaka, H Nishikawa, and H Watari. 1985. "In Vivo Studies of

- Energy Metabolism in Experimental Cerebral Ischemia Using Topical Magnetic Resonance. Changes in ³¹P-Nuclear Magnetic Resonance Spectra Compared with Electroencephalograms and Regional Cerebral Blood Flow." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 5 (2): 235–40. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1985.30>.
- Hoshi, Akihiko, Toshiki Nakahara, Hisae Kayama, and Teiji Yamamoto. 2006. "Ischemic Tolerance in Chemical Preconditioning: Possible Role of Astrocytic Glutamine Synthetase Buffering Glutamate-Mediated Neurotoxicity." *Journal of Neuroscience Research* 84 (1): 130–41. <https://doi.org/10.1002/jnr.20869>.
- Hossmann, K A. 1991. "Animal Models of Cerebral Ischemia. 1. Review of Literature." *Cerebrovascular Diseases* 1(suppl 1) (Suppl. 1): 2–15. <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000108875>.
- . 2012. "The Two Pathophysiologies of Focal Brain Ischemia: Implications for Translational Stroke Research." *J Cereb Blood Flow Metab* 32 (7): 1310–16. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.186>.
- Howells, D W, E S Sena, and M R Macleod. 2014. "Bringing Rigour to Translational Medicine." *Nat Rev Neurol* 10 (1): 37–43. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.232>.
- Howells, David W, Michelle J Porritt, Sarah S J Rewell, Victoria O'Collins, Emily S Sena, H Bart van der Worp, Richard J Traystman, and Malcolm R Macleod. 2010. "Different Strokes for Different Folks: The Rich Diversity of Animal Models of Focal Cerebral Ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 30 (8): 1412–31. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.66>.
- Hu, Y Y, J Xu, M Zhang, D Wang, L Li, and W B Li. 2015. "Ceftriaxone Modulates Uptake Activity of Glial Glutamate Transporter-1 against Global Brain Ischemia in Rats." *J Neurochem* 132 (2): 194–205. <https://doi.org/10.1111/jnc.12958>.
- Hughes, Ethan G, Jamie L Maguire, Melanie T McMinn, Rachael E Scholz, and Margaret L Sutherland. 2004. "Loss of Glial Fibrillary Acidic Protein Results in Decreased Glutamate Transport and Inhibition of PKA-Induced EAAT2 Cell Surface Trafficking." *Molecular Brain Research* 124 (2): 114–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.02.021>.
- Hunter, A J, J Hatcher, D Virley, P Nelson, E Irving, S J Hadingham, and A A Parsons. 2000. "Functional Assessments in Mice and Rats after Focal Stroke." *Neuropharmacology* 39 (5): 806–16. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(99\)00262-2](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00262-2).
- Inui, T, B Alessandri, A Heimann, F Nishimura, K Frauenknecht, C Sommer, and O Kempfski. 2013. "Neuroprotective Effect of Ceftriaxone on the Penumbra in a Rat Venous Ischemia Model." *Neuroscience* 242: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.018>.
- Jeitner, Thomas M, Kevin Battaile, and Arthur J L Cooper. 2015. "Critical Evaluation of the Changes in Glutamine Synthetase Activity in Models of Cerebral Stroke." *Neurochemical Research* 40 (12): 2544–56. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1667-1>.
- Jiang, P, C Chen, R Wang, O V Chechneva, S H Chung, M S Rao, D E Pleasure, Y Liu, Q Zhang, and W Deng. 2013. "HESC-Derived Olig2+ Progenitors Generate a Subtype of Astroglia with Protective Effects against Ischaemic Brain Injury." *Nat Commun* 4: 2196. <https://doi.org/10.1038/ncomms3196>.
- Jiang, Yongjun, Ning Wei, Juehua Zhu, Tingting Lu, Zhaoyao Chen, Gelin Xu, and Xinfeng Liu. 2010. "Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor on Local Inflammation in Experimental Stroke of Rat." *Mediators of Inflammation* 2010: 10. <https://doi.org/10.1155/2010/372423>.
- Katsura, K, T Kristian, and B K Siesjo. 1994. "Energy Metabolism, Ion Homeostasis, and Cell Damage in the Brain." *Biochem Soc Trans* 22 (4): 991–96.
- Kaur, C, and E A Ling. 2008. "Blood Brain Barrier in Hypoxic-Ischemic Conditions." *Curr Neurovasc Res* 5 (1): 71–81.
- Khoury, N, K B Koronowski, and M A Perez-Pinzon. 2016. "Long-Term Window of Ischemic Tolerance: An Evolutionarily Conserved Form of Metabolic Plasticity Regulated by Epigenetic Modifications?" *J Neurol Neuromedicine* 1 (2): 6–12.
- Koehler, R C, R J Roman, and D R Harder. 2009. "Astrocytes and the Regulation of Cerebral Blood Flow." *Trends Neurosci* 32 (3): 160–69. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.005>.
- Koton, S, A L Schneider, W D Rosamond, E Shahar, Y Sang, R F Gottesman, and J Coresh. 2014. "Stroke Incidence and Mortality Trends in US Communities, 1987 to 2011." *Jama* 312 (3): 259–68. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.7692>.
- Kramer, M, J Dang, F Baertling, B Denecke, T Clarner, C Kirsch, C Beyer, and M Kipp. 2010. "TTC Staining of Damaged Brain Areas after MCA Occlusion in the Rat Does Not Constrict Quantitative Gene and Protein Analyses." *J Neurosci Methods* 187 (1): 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.12.020>.
- Krebs, H A. 1935. "Metabolism of Amino-Acids: The Synthesis of Glutamine from Glutamic Acid and

- Ammonia, and the Enzymic Hydrolysis of Glutamine in Animal Tissues." *Biochem J* 29 (8): 1951–69. <https://doi.org/10.1042/bj0291951>.
- Kreft, M, L K Bak, H S Waagepetersen, and A Schousboe. 2012. "Aspects of Astrocyte Energy Metabolism, Amino Acid Neurotransmitter Homeostasis and Metabolic Compartmentation." *ASN Neuro* 4 (3). <https://doi.org/10.1042/an20120007>.
- Krishnamurthi, R V, V L Feigin, M H Forouzanfar, G A Mensah, M Connor, D A Bennett, A E Moran, et al. 2013. "Global and Regional Burden of First-Ever Ischaemic and Haemorrhagic Stroke during 1990-2010: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet Glob Health* 1 (5): e259-81. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(13\)70089-5](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(13)70089-5).
- Krzyzanowska, W, and B Pomierny. 2017. "Ceftriaxone- and N-Acetylcysteine-Induced Brain Tolerance to Ischemia: Influence on Glutamate Levels in Focal Cerebral Ischemia" 12 (10): e0186243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186243>.
- Krzyzanowska, W, B Pomierny, B Budziszewska, M Filip, and J Pera. 2016. "N-Acetylcysteine and Ceftriaxone as Preconditioning Strategies in Focal Brain Ischemia: Influence on Glutamate Transporters Expression." *Neurotox Res* 29 (4): 539–50. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186243> 10.1007/s12640-016-9602-z.
- Krzyzanowska, W, B Pomierny, M Filip, and J Pera. 2014. "Glutamate Transporters in Brain Ischemia: To Modulate or Not?" *Acta Pharmacol Sin* 35 (4): 444–62. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.1>.
- Kurbat, M N, and V V Lelevich. 2009. "Metabolism of Amino Acids in the Brain." *Neurochemical Journal* 3 (1): 23–28. <https://doi.org/10.1134/s1819712409010036>.
- Lai, T W, S Zhang, and Y T Wang. 2014. "Excitotoxicity and Stroke: Identifying Novel Targets for Neuroprotection." *Prog Neurobiol* 115: 157–88. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>.
- Lebon, V, K F Petersen, G W Cline, J Shen, G F Mason, S Dufour, K L Behar, G I Shulman, and D L Rothman. 2002. "Astroglial Contribution to Brain Energy Metabolism in Humans Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Elucidation of the Dominant Pathway for Neurotransmitter Glutamate Repletion and Measurement of Astrocytic Oxidative Metabolism." *J Neurosci* 22 (5): 1523–31.
- Lee, S G, Z Z Su, L Emdad, P Gupta, D Sarkar, A Borjabad, D J Volsky, and P B Fisher. 2008. "Mechanism of Ceftriaxone Induction of Excitatory Amino Acid Transporter-2 Expression and Glutamate Uptake in Primary Human Astrocytes." *J Biol Chem* 283 (19): 13116–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707697200>.
- Lehotsky, J, J Burda, V Danielisova, M Gottlieb, P Kaplan, and B Saniova. 2009. "Ischemic Tolerance: The Mechanisms of Neuroprotective Strategy." *Anat Rec (Hoboken)* 292 (12): 2002–12. <https://doi.org/10.1002/ar.20970>.
- Li, K, J Li, J Zheng, and S Qin. 2019. "Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases." *Aging Dis* 10 (3): 664–75. <https://doi.org/10.14336/ad.2018.0720>.
- Li, L, A Lundkvist, D Andersson, U Wilhelmsson, N Nagai, A C Pardo, C Nodin, et al. 2008a. "Protective Role of Reactive Astrocytes in Brain Ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 28 (3): 468–81. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600546>.
- . 2008b. "Protective Role of Reactive Astrocytes in Brain Ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab* 28 (3): 468–81. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600546>.
- Lieth, E, A J Barber, B Xu, C Dice, M J Ratz, D Tanase, and J M Strother. 1998. "Glial Reactivity and Impaired Glutamate Metabolism in Short-Term Experimental Diabetic Retinopathy. Penn State Retina Research Group." *Diabetes* 47 (5): 815–20.
- Lipski, J, C K Wan, J Z Bai, R Pi, D Li, and D Donnelly. 2007. "Neuroprotective Potential of Ceftriaxone in in Vitro Models of Stroke." *Neuroscience* 146 (2): 617–29. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.003>.
- Liu, Jin, Yong-Ming Zhu, Yi Guo, Liang Lin, Zhan-Xiang Wang, Feng Gu, Xin-Yi Dong, Ming Zhou, Yi-Fan Wang, and Hui-Ling Zhang. 2020. "Inhibition of GSK3 β and RIP1K Attenuates Glial Scar Formation Induced by Ischemic Stroke via Reduction of Inflammatory Cytokine Production." *Frontiers in Pharmacology* 11: 812. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00812>.
- Liu, T, R K Clark, P C McDonnell, P R Young, R F White, F C Barone, and G Z Feuerstein. 1994. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Expression in Ischemic Neurons." *Stroke* 25 (7): 1481–88. <https://doi.org/10.1161/01.str.25.7.1481>.
- Liu, Y, S Mituska, K Hashizume, T Hosaka, and H Nukui. 1996. "The Time Course of Glucose Metabolism in Rat Cerebral Ischemia with Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion Model and the Effect of MK-801." *Neurological Research* 18 (6): 505–8. <https://doi.org/10.1080/01616412.1996.11740462>.
- Lujia, Y, L Xin, W Shiquan, C Yu, Z Shuzhuo, and Z Hong. 2014. "Ceftriaxone Pretreatment Protects Rats against Cerebral Ischemic Injury by Attenuating Microglial Activation-Induced IL-1 β

- Expression." *Int J Neurosci* 124 (9): 657–65. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.856009>.
- Lutas, Andrew, and Gary Yellen. 2013. "The Ketogenic Diet: Metabolic Influences on Brain Excitability and Epilepsy." *Trends in Neurosciences* 36 (1): 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.005>.
- Magistretti I., P J and Allaman, and D W Pfaff. 2013. "Brain Energy Metabolism." In *Fundamental Neuroscience*, edited by L R Squire Berg, D., Bloom, F.E., du Lac, S., Ghosh, A., and Spitzer, N.C., 3rd ed., 271–93. Elsevier. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6_56.
- Magistretti, P J. 1999. "Energy Metabolism." In *Fundamental Neuroscience*, edited by Zigmund MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, and Squire LR, 389–413. San Diego: Academic Press.
- Malarkey, E B, and V Parpura. 2008. "Mechanisms of Glutamate Release from Astrocytes." *Neurochem Int* 52 (1–2): 142–54. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.005>.
- Markgraf, C G, E J Green, B Watson, P M McCabe, N Schneiderman, W D Dietrich, and M D Ginsberg. 1994. "Recovery of Sensorimotor Function after Distal Middle Cerebral Artery Photothrombotic Occlusion in Rats." *Stroke* 25 (1): 153–59. <https://doi.org/10.1161/01.str.25.1.153>.
- Martin, R L, H G Lloyd, and A I Cowan. 1994. "The Early Events of Oxygen and Glucose Deprivation: Setting the Scene for Neuronal Death?" *Trends Neurosci* 17 (6): 251–57.
- Masino, Susan A, and Jong M Rho. 2010. "Mechanisms of Ketogenic Diet Action." *Epilepsia* 51 (s5): 85. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02871.x>.
- Mayor, D, and M Tymianski. 2018. "Neurotransmitters in the Mediation of Cerebral Ischemic Injury." *Neuropharmacology* 134 (Pt B): 178–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.050>.
- McDunn, J E, and J P Cobb. 2005. "That Which Does Not Kill You Makes You Stronger: A Molecular Mechanism for Preconditioning." *Sci STKE* 2005 (291): pe34. <https://doi.org/10.1126/stke.2912005pe34>.
- McIlwain, H. 1956. "Electrical Influences and Speed of Chemical Change in the Brain." *Physiol Rev* 36 (3): 355–75.
- McKenna, M C. 2007. "The Glutamate-Glutamine Cycle Is Not Stoichiometric: Fates of Glutamate in Brain." *J Neurosci Res* 85 (15): 3347–58. <https://doi.org/10.1002/jnr.21444>.
- . 2012. "Substrate Competition Studies Demonstrate Oxidative Metabolism of Glucose, Glutamate, Glutamine, Lactate and 3-Hydroxybutyrate in Cortical Astrocytes from Rat Brain." *Neurochem Res* 37 (11): 2613–26. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0901-3>.
- . 2013. "Glutamate Pays Its Own Way in Astrocytes." *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 191. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00191>.
- McKenna, M C, U Sonnewald, X Huang, J Stevenson, and H R Zielke. 1996. "Exogenous Glutamate Concentration Regulates the Metabolic Fate of Glutamate in Astrocytes." *J Neurochem* 66 (1): 386–93.
- McKenna, M C, J T Tildon, J H Stevenson, and X Huang. 1996. "New Insights into the Compartmentation of Glutamate and Glutamine in Cultured Rat Brain Astrocytes." *Dev Neurosci* 18 (5–6): 380–90.
- McKenna, Mary C., J. Tyson Tildon, René Couto, Joseph H. Stevenson, and Francis J. Caprio. 1990. "The Metabolism of Malate by Cultured Rat Brain Astrocytes." *Neurochemical Research* 15 (12): 1211–20. <https://doi.org/10.1007/BF01208582>.
- McKenna, Mary C, Gerald A Dienel, Ursula Sonnewald, Helle S Waagepetersen, and Arne Schousboe. 2012. "Chapter 11 - Energy Metabolism of the Brain." In *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)*, edited by Scott T Brady, George J Siegel, R Wayne Albers, and Donald L Price, 200–231. New York: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00011-0>.
- Mergenthaler, Philipp, Ulrich Dirnagl, and Alexander Kunz. 2013. "Ischemic Stroke: Basic Pathophysiology and Clinical Implication." In *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, edited by Donald W Pfaff, 2543–63. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6_97.
- Mergenthaler, Philipp, Ute Lindauer, Gerald A Dienel, and Andreas Meisel. 2013. "Sugar for the Brain: The Role of Glucose in Physiological and Pathological Brain Function." *Trends in Neurosciences* 36 (10): 587–97. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>.
- Minami, M, Y Kuraishi, K Yabuuchi, A Yamazaki, and M Satoh. 1992. "Induction of Interleukin-1 Beta mRNA in Rat Brain after Transient Forebrain Ischemia." *Journal of Neurochemistry* 58 (1): 390–92. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09324.x>.
- Ministério Da Saúde. 2012. "Acidente Vascular Cerebral (AVC)." <http://www.brasil.gov.br/saude/2012/04/acidente-vascular-cerebral-avc>. 2012.
- Minnerup, Jens, Brad A Sutherland, Alastair M Buchan, and Christoph Kleinschnitz. 2012. "Neuroprotection for Stroke: Current Status and Future Perspectives." *International Journal of*

- Molecular Sciences* 13 (9): 11753–72. <https://doi.org/10.3390/ijms130911753>.
- Mitani, Akira, and Kohichi Tanaka. 2003. "Functional Changes of Glial Glutamate Transporter GLT-1 during Ischemia: An in Vivo Study in the Hippocampal CA1 of Normal Mice and Mutant Mice Lacking GLT-1." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (18): 7176–82. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-18-07176.2003>.
- Mosienko, Valentina, Anja G. Teschemacher, and Sergey Kasparov. 2015. "Is L-Lactate a Novel Signaling Molecule in the Brain?" *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35 (7): 1069–75. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.77>.
- Mozaffarian, D, E J Benjamin, A S Go, D K Arnett, M J Blaha, M Cushman, S R Das, et al. 2016. "Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association." *Circulation* 133 (4): e38–360. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000350>.
- Muir, K W, P Tyrrell, N Sattar, and E Warburton. 2007. "Inflammation and Ischaemic Stroke." *Curr Opin Neurol* 20 (3): 334–42. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32813ba151>.
- Nawashiro, H, M Brenner, S Fukui, K Shima, and J M Hallenbeck. 2000. "High Susceptibility to Cerebral Ischemia in GFAP-Null Mice." *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (7): 1040–44. <https://doi.org/10.1097/00004647-200007000-00003>.
- Nedergaard, M, and U Dirnagl. 2005. "Role of Glial Cells in Cerebral Ischemia." *Glia* 50 (4): 281–86. <https://doi.org/10.1002/glia.20205>.
- Nedergaard, M, T Takano, and A J Hansen. 2002. "Beyond the Role of Glutamate as a Neurotransmitter." *Nat Rev Neurosci* 3 (9): 748–55. <https://doi.org/10.1038/nrn916>.
- Newsholme, P., M. M.R. Lima, J. Procopio, T. C. Pithon-Curi, S. Q. Doi, R. B. Bazotte, and R. Curi. 2003. "Glutamine and Glutamate as Vital Metabolites." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36 (2): 153–63. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000200002>.
- Nonose, Y., P.E. E Gewehr, R.F. F Almeida, J.S. S da Silva, B. Bellaver, L.A.M. A Martins, E.R. R Zimmer, et al. 2018. "Cortical Bilateral Adaptations in Rats Submitted to Focal Cerebral Ischemia: Emphasis on Glial Metabolism." *Mol Neurobiol* 55 (3). <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0458-x>.
- O'Collins, Victoria E, Malcolm R Macleod, Geoffrey A Donnan, Laura L Horky, Bart H van der Worp, and David W Howells. 2006. "1,026 Experimental Treatments in Acute Stroke." *Annals of Neurology* 59 (3): 467–77. <https://doi.org/10.1002/ana.20741>.
- Ohki, S, H Togari, H Sobajima, S Fujimoto, M Kobayashi, and J Hyodo. 1999. "Lactate Attenuates Neuron Specific Enolase Elevation in Newborn Rats." *Pediatric Neurology* 21 (2): 543–47. [https://doi.org/10.1016/s0887-8994\(99\)00039-9](https://doi.org/10.1016/s0887-8994(99)00039-9).
- Ottersen, Ole Petter, Jon H Laake, Winfried Reichelt, Finn-Mogens Haug, and Reidun Torp. 1996. "Ischemic Disruption of Glutamate Homeostasis in Brain: Quantitative Immunocytochemical Analyses." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 12 (1): 1–14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(96\)00178-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-0618(96)00178-0).
- Ouyang, Y B, L A Voloboueva, L J Xu, and R G Giffard. 2007. "Selective Dysfunction of Hippocampal CA1 Astrocytes Contributes to Delayed Neuronal Damage after Transient Forebrain Ischemia." *J Neurosci* 27 (16): 4253–60. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0211-07.2007>.
- Panickar, K S, and M D Norenberg. 2005. "Astrocytes in Cerebral Ischemic Injury: Morphological and General Considerations." *Glia* 50 (4): 287–98. <https://doi.org/10.1002/glia.20181>.
- Patet, C, H Quintard, T Suys, J Bloch, R T Daniel, L Pellerin, P J Magistretti, and M Oddo. 2015. "Neuroenergetic Response to Prolonged Cerebral Glucose Depletion after Severe Brain Injury and the Role of Lactate." *J Neurotrauma* 32 (20): 1560–66. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3781>.
- Pekny, M, U Wilhelmsson, T Tatlisumak, and M Pekna. 2019. "Astrocyte Activation and Reactive Gliosis-A New Target in Stroke?" *Neurosci Lett* 689: 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.021>.
- Pellerin, L, L H Bergersen, A P Halestrap, and K Pierre. 2005. "Cellular and Subcellular Distribution of Monocarboxylate Transporters in Cultured Brain Cells and in the Adult Brain." *J Neurosci Res* 79 (1–2): 55–64. <https://doi.org/10.1002/jnr.20307>.
- Pellerin, L, and P J Magistretti. 1994. "Glutamate Uptake into Astrocytes Stimulates Aerobic Glycolysis: A Mechanism Coupling Neuronal Activity to Glucose Utilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (22): 10625–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC45074/>.
- Petito, C K, and T Babiak. 1982. "Early Proliferative Changes in Astrocytes in Postischemic Noninfarcted Rat Brain." *Ann Neurol* 11 (5): 510–18. <https://doi.org/10.1002/ana.410110511>.
- Phillis, J W, M H O'Regan, A Y Estevez, D Song, and S J VanderHeide. 1996. "Cerebral Energy Metabolism during Severe Ischemia of Varying Duration and Following Reperfusion." *J Neurochem* 67 (4): 1525–31.

- Phillis, J W, J Ren, and M H O'Regan. 2000. "Transporter Reversal as a Mechanism of Glutamate Release from the Ischemic Rat Cerebral Cortex: Studies with DL-Threo-Beta-Benzyloxyaspartate." *Brain Res* 880 (1–2): 224.
- Philp, N J, H Yoon, and L Lombardi. 2001. "Mouse MCT3 Gene Is Expressed Preferentially in Retinal Pigment and Choroid Plexus Epithelia." *Am J Physiol Cell Physiol* 280 (5): C1319–26.
- Pierre, K, P J Magistretti, and L Pellerin. 2002. "MCT2 Is a Major Neuronal Monocarboxylate Transporter in the Adult Mouse Brain." *J Cereb Blood Flow Metab* 22 (5): 586–95. <https://doi.org/10.1097/00004647-200205000-00010>.
- Pierre, K, and L Pellerin. 2005. "Monocarboxylate Transporters in the Central Nervous System: Distribution, Regulation and Function." *J Neurochem* 94 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x>.
- Prins, Mayumi L. 2008. "Cerebral Metabolic Adaptation and Ketone Metabolism after Brain Injury." *J Cereb Blood Flow Metab* 28 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600543>.
- Rafiki, A, J L Boulland, A P Halestrap, O P Ottersen, and L Bergersen. 2003. "Highly Differential Expression of the Monocarboxylate Transporters MCT2 and MCT4 in the Developing Rat Brain." *Neuroscience* 122 (3): 677–88.
- Ramonet, D, M J Rodríguez, K Fredriksson, F Bernal, and N Mahy. 2004. "In Vivo Neuroprotective Adaptation of the Glutamate/Glutamine Cycle to Neuronal Death." *Hippocampus* 14 (5): 586–94. <https://doi.org/10.1002/hipo.10188>.
- Ramos-Cabrer, Pedro, Francisco Campos, Tomás Sobrino, and José Castillo. 2011. "Targeting the Ischemic Penumbra." *Stroke* 42 (1 Suppl): S7–11. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.596684>.
- Rao, V L, K K Bowen, and R J Dempsey. 2001. "Transient Focal Cerebral Ischemia Down-Regulates Glutamate Transporters GLT-1 and EAAC1 Expression in Rat Brain." *Neurochemical Research* 26 (5): 497–502. <https://doi.org/10.1023/a:1010956711295>.
- Reger, Maxine L, David A Hovda, and Christopher C Giza. 2009. "Ontogeny of Rat Recognition Memory Measured by the Novel Object Recognition Task." *Developmental Psychobiology* 51 (8): 672–78. <https://doi.org/10.1002/dev.20402>.
- Rehme, Anne K, and Christian Grefkes. 2013. "Cerebral Network Disorders after Stroke: Evidence from Imaging-Based Connectivity Analyses of Active and Resting Brain States in Humans." *The Journal of Physiology* 591 (1): 17–31. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.243469>.
- Robinet, C, and L Pellerin. 2011. "Brain-Derived Neurotrophic Factor Enhances the Hippocampal Expression of Key Postsynaptic Proteins in Vivo Including the Monocarboxylate Transporter MCT2." *Neuroscience* 192: 155–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.059>.
- Robinet, Camille, and Luc Pellerin. 2010. "Brain-Derived Neurotrophic Factor Enhances the Expression of the Monocarboxylate Transporter 2 through Translational Activation in Mouse Cultured Cortical Neurons." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30 (2): 286–98. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.208>.
- Rojas, Santiago, Abraham Martín, Maria J Arranz, Deborah Pareto, Jesús Purroy, Esther Verdaguer, Jordi Llop, et al. 2007. "Imaging Brain Inflammation with [(11)C]PK11195 by PET and Induction of the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor after Transient Focal Ischemia in Rats." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27 (12): 1975–86. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600500>.
- Rosafio, K, X Castillo, L Hirt, and L Pellerin. 2016. "Cell-Specific Modulation of Monocarboxylate Transporter Expression Contributes to the Metabolic Reprogramming Taking Place Following Cerebral Ischemia." *Neuroscience* 317: 108–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.052>.
- Rosafio, K, and L Pellerin. 2014. "Oxygen Tension Controls the Expression of the Monocarboxylate Transporter MCT4 in Cultured Mouse Cortical Astrocytes via a Hypoxia-Inducible Factor-1alpha-Mediated Transcriptional Regulation." *Glia* 62 (3): 477–90. <https://doi.org/10.1002/glia.22667>.
- Rothstein, J D, L Jin, M Dykes-Hoberg, and R W Kuncl. 1993. "Chronic Inhibition of Glutamate Uptake Produces a Model of Slow Neurotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (14): 6591–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6591>.
- Rothstein, J D, S Patel, M R Regan, C Haenggeli, Y H Huang, D E Bergles, L Jin, et al. 2005. "Beta-Lactam Antibiotics Offer Neuroprotection by Increasing Glutamate Transporter Expression." *Nature* 433 (7021): 73–77. <https://doi.org/10.1038/nature03180>.
- Rothstein, Jeffrey D, and Boris Tabakoff. 1985. "Glial and Neuronal Glutamate Transport Following Glutamine Synthetase Inhibition." *Biochemical Pharmacology* 34 (1): 73–79.

- [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90102-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90102-9).
- Schousboe, A, L K Bak, and H S Waagepetersen. 2013. "Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA." *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 102. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00102>.
- Selmaj, K W, M Farooq, W T Norton, C S Raine, and C F Brosnan. 1990. "Proliferation of Astrocytes in Vitro in Response to Cytokines. A Primary Role for Tumor Necrosis Factor." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 144 (1): 129–35.
- Shank, R. P., and G. Campbell LeM. 1984. "Amino Acid Uptake, Content, and Metabolism by Neuronal and Glial Enriched Cellular Fractions from Mouse Cerebellum." *Journal of Neuroscience* 4 (1): 58–69. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.04-01-00058.1984>.
- Shank, R P, and G L Campbell. 1984. "Alpha-Ketoglutarate and Malate Uptake and Metabolism by Synaptosomes: Further Evidence for an Astrocyte-to-Neuron Metabolic Shuttle." *Journal of Neurochemistry* 42 (4): 1153–61. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12724.x>.
- Sharp, F R, R Ran, A Lu, Y Tang, K I Strauss, T Glass, T Ardizzone, and M Bernaudin. 2004. "Hypoxic Preconditioning Protects against Ischemic Brain Injury." *NeuroRx* 1 (1): 26–35. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.1.26>.
- Shen, J, K F Petersen, K L Behar, P Brown, T W Nixon, G F Mason, O A Petroff, G I Shulman, R G Shulman, and D L Rothman. 1999. "Determination of the Rate of the Glutamate/Glutamine Cycle in the Human Brain by in Vivo ¹³C NMR." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (14): 8235–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8235>.
- Shin, Tae Hwan, Da Yeon Lee, Shaherin Basith, Balachandran Manavalan, Man Jeong Paik, Igor Rybinnik, M Maral Mouradian, Jung Hwan Ahn, and Gwang Lee. 2020. "Metabolome Changes in Cerebral Ischemia." *Cells* 9 (7): 1630. <https://doi.org/10.3390/cells9071630>.
- Siesjö, B K, Q Zhao, K Pahlmark, P Siesjö, K Katsura, and J Folbergrová. 1995. "Glutamate, Calcium, and Free Radicals as Mediators of Ischemic Brain Damage." *The Annals of Thoracic Surgery* 59 (5): 1316–20. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(95\)00077-x](https://doi.org/10.1016/0003-4975(95)00077-x).
- Singh, N, G Sharma, and V Mishra. 2012. "Hypoxia Inducible Factor-1: Its Potential Role in Cerebral Ischemia." *Cell Mol Neurobiol* 32 (4): 491–507. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9803-9>.
- Siracusa, Rosalba, Roberta Fusco, and Salvatore Cuzzocrea. 2019. "Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies." *Frontiers in Pharmacology* 10 (September): 1114. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01114>.
- Sitcheran, Raquel, Pankaj Gupta, Paul B Fisher, and Albert S Baldwin. 2005. "Positive and Negative Regulation of EAAT2 by NF-KappaB: A Role for N-Myc in TNFalpha-Controlled Repression." *The EMBO Journal* 24 (3): 510–20. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600555>.
- Sobowale, Oluwaseun A, Adrian R Parry-Jones, Craig J Smith, Pippa J Tyrrell, Nancy J Rothwell, and Stuart M Allan. 2016. "Interleukin-1 in Stroke." *Stroke* 47 (8): 2160–67. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.010001>.
- Sofroniew, M V, and H V Vinters. 2010. "Astrocytes: Biology and Pathology." *Acta Neuropathol* 119 (1): 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>.
- Sommer, Clemens J. 2017. "Ischemic Stroke: Experimental Models and Reality." *Acta Neuropathol* 133 (2): 245–61. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0>.
- Song, B C, N S Joo, G Aldini, and K J Yeum. 2014. "Biological Functions of Histidine-Dipeptides and Metabolic Syndrome." *Nutr Res Pract* 8 (1): 3–10. <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.1.3>.
- Sonnewald, U, N Westergaard, S B Petersen, G Unsgard, and A Schousboe. 1993. "Metabolism of [U-¹³C]Glutamate in Astrocytes Studied by ¹³C NMR Spectroscopy: Incorporation of More Label into Lactate than into Glutamine Demonstrates the Importance of the Tricarboxylic Acid Cycle." *J Neurochem* 61 (3): 1179–82.
- Souza, Débora G, Roberto F Almeida, Diogo O Souza, and Eduardo R Zimmer. 2019. "The Astrocyte Biochemistry." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 95 (November): 142–50. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.002>.
- Stenzel-Poore, M P, S L Stevens, and R P Simon. 2004. "Genomics of Preconditioning." *Stroke* 35 (11 Suppl 1): 2683–86. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143735.89281.bb>.
- Stenzel-Poore, M P, S L Stevens, Z Xiong, N S Lessov, C A Harrington, M Mori, R Meller, et al. 2003. "Effect of Ischaemic Preconditioning on Genomic Response to Cerebral Ischaemia: Similarity to Neuroprotective Strategies in Hibernation and Hypoxia-Tolerant States." *Lancet* 362 (9389): 1028–37. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14412-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14412-1).
- Stetler, R A, R K Leak, Y Gan, P Li, F Zhang, X Hu, Z Jing, J Chen, M J Zigmond, and Y Gao. 2014. "Preconditioning Provides Neuroprotection in Models of CNS Disease: Paradigms and Clinical Significance." *Prog Neurobiol* 114: 58–83. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.005>.
- Strom, J O, E Ingberg, A Theodorsson, and E Theodorsson. 2013. "Method Parameters' Impact on

- Mortality and Variability in Rat Stroke Experiments: A Meta-Analysis." *BMC Neurosci* 14: 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-41>.
- Surawan, Jesada, Teabpaluck Sirithanawutichai, Suchat Areemit, Somsak Tiamkao, and Suprawita Saensak. 2018. "Prevalence and Factors Associated with Memory Disturbance and Dementia after Acute Ischemic Stroke." *Neurology International* 10 (3): 7761. <https://doi.org/10.4081/ni.2018.7761>.
- Suzuki, Masataka, Jumpei Sasabe, Yurika Miyoshi, Kanako Kuwasako, Yutaka Muto, Kenji Hamase, Masaaki Matsuoka, Nobuaki Imanishi, and Sadakazu Aiso. 2015. "Glycolytic Flux Controls D-Serine Synthesis through Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Astrocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (17): E2217 LP-E2224. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416117112>.
- Swanson, R A, and S H Graham. 1994. "Fluorocitrate and Fluoroacetate Effects on Astrocyte Metabolism in Vitro." *Brain Research* 664 (1–2): 94–100. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91958-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91958-5).
- Swanson, R A, W Ying, and T M Kauppinen. 2004. "Astrocyte Influences on Ischemic Neuronal Death." *Curr Mol Med* 4 (2): 193–205.
- Szele, F G, C Alexander, and M F Chesselet. 1995. "Expression of Molecules Associated with Neuronal Plasticity in the Striatum after Aspiration and Thermocoagulatory Lesions of the Cerebral Cortex in Adult Rats." *J Neurosci* 15 (6): 4429–48.
- Taher, Marjan, Wilhelmina G Leen, Ron A Wevers, and Michèl A Willemsen. 2016. "Lactate and Its Many Faces." *European Journal of Paediatric Neurology: EJPEN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society* 20 (1): 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2015.09.008>.
- Takatsuru, Y, J Nabekura, and N Koibuchi. 2014. "Contribution of Neuronal and Glial Circuit in Intact Hemisphere for Functional Remodeling after Focal Ischemia." *Neurosci Res* 78: 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.07.004>.
- Takatsuru, Yusuke, Dai Fukumoto, Miki Yoshitomo, Tomomi Nemoto, Hideo Tsukada, and Junichi Nabekura. 2009. "Neuronal Circuit Remodeling in the Contralateral Cortical Hemisphere during Functional Recovery from Cerebral Infarction." *The Journal of Neuroscience* 29 (32): 10081 LP – 10086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1638-09.2009>.
- Takizawa, S, and A M Hakim. 1991. "Animal Models of Cerebral Ischemia. 2. Rat Models." *Cerebrovascular Diseases* 1(suppl 1) (Suppl. 1): 16–21. <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000108876>.
- Tan, H H, J Xu, H L Teoh, B P Chan, R C Seet, N Venketasubramanian, V K Sharma, C L Chen, and Y Dong. 2017. "Decline in Changing Montreal Cognitive Assessment (MoCA) Scores Is Associated with Post-Stroke Cognitive Decline Determined by a Formal Neuropsychological Evaluation." *PLoS One* 12 (3): e0173291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173291>.
- Taoufik, Era, Edwige Petit, Didier Divoux, Vivian Tseveleki, Manuela Mengozzi, Michael L Roberts, Samuel Valable, et al. 2008. "TNF Receptor I Sensitizes Neurons to Erythropoietin- and VEGF-Mediated Neuroprotection after Ischemic and Excitotoxic Injury." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (16): 6185–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801447105>.
- Thone-Reineke, C, C Neumann, P Namsolleck, K Schmerbach, M Krikov, J H Schempe, K Lucht, et al. 2008. "The Beta-Lactam Antibiotic, Ceftriaxone, Dramatically Improves Survival, Increases Glutamate Uptake and Induces Neurotrophins in Stroke." *J Hypertens* 26 (12): 2426–35. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328313e403>.
- Touzani, O, H Boutin, J Chuquet, and N Rothwell. 1999. "Potential Mechanisms of Interleukin-1 Involvement in Cerebral Ischaemia." *Journal of Neuroimmunology* 100 (1–2): 203–15. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(99\)00202-7](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(99)00202-7).
- Verma, R, V Mishra, D Sasmal, and R Raghubir. 2010. "Pharmacological Evaluation of Glutamate Transporter 1 (GLT-1) Mediated Neuroprotection Following Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury." *Eur J Pharmacol* 638 (1–3): 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.021>.
- Vos, Theo, Ryan M Barber, Brad Bell, Amelia Bertozzi-Villa, Stan Biryukov, Ian Bolliger, Fiona Charlson, et al. 2015. "Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 301 Acute and Chronic Diseases and Injuries in 188 Countries, 1990–2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." *The Lancet* 386 (9995): 743–800. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4).
- Wang, Y, C Reis, R Applegate 2nd, G Stier, R Martin, and J H Zhang. 2015. "Ischemic Conditioning-Induced Endogenous Brain Protection: Applications Pre-, per- or Post-Stroke." *Exp Neurol* 272: 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.04.009>.
- Weir, M D, and D G Thomas. 1984. "Effect of Dexamethasone on Glutamine Synthetase and Glial

- Fibrillary Acidic Protein in Normal and Transformed Astrocytes." *Clin Neuropharmacol* 7 (4): 303–6.
- Wiener, C M, G Booth, and G L Semenza. 1996. "In Vivo Expression of MRNAs Encoding Hypoxia-Inducible Factor 1." *Biochem Biophys Res Commun* 225 (2): 485–88. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1199>.
- Wittenberg, G F, R Chen, K Ishii, K O Bushara, S Eckloff, E Croarkin, E Taub, L H Gerber, M Hallett, and L G Cohen. 2003. "Constraint-Induced Therapy in Stroke: Magnetic-Stimulation Motor Maps and Cerebral Activation." *Neurorehabil Neural Repair* 17 (1): 48–57.
- Wu, Qiu Jing, and Michael Tymianski. 2018. "Targeting NMDA Receptors in Stroke: New Hope in Neuroprotection." *Molecular Brain* 11 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0357-8>.
- Xu, Sui-Yi, and Su-Yue Pan. 2013. "The Failure of Animal Models of Neuroprotection in Acute Ischemic Stroke to Translate to Clinical Efficacy." *Medical Science Monitor Basic Research* 19: 37–45. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.883750>.
- Yamada, J, and S Jinno. 2011. "Alterations in Neuronal Survival and Glial Reactions after Axotomy by Ceftriaxone and Minocycline in the Mouse Hypoglossal Nucleus." *Neurosci Lett* 504 (3): 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.09.051>.
- Yang, Mingxing, Shu Wang, Fuhua Hao, Yajie Li, Huiru Tang, and Xuemin Shi. 2012. "NMR Analysis of the Rat Neurochemical Changes Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion." *Talanta* 88: 136–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.022>.
- Yu, M, Y Xue, W Liang, Y Zhang, and Z Zhang. 2015. "Protection Mechanism of Early Hyperbaric Oxygen Therapy in Rats with Permanent Cerebral Ischemia." *J Phys Ther Sci* 27 (10): 3271–74. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.3271>.
- Yudkoff, M. 1997. "Brain Metabolism of Branched-Chain Amino Acids." *Glia* 21 (1): 92–98. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199709\)21:1<92::aid-glia10>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199709)21:1<92::aid-glia10>3.0.co;2-w).
- Zhang, L, J Chen, Y Li, Z G Zhang, and M Chopp. 2000. "Quantitative Measurement of Motor and Somatosensory Impairments after Mild (30 Min) and Severe (2 h) Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats." *Journal of the Neurological Sciences* 174 (2): 141–46. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(00\)00268-9](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(00)00268-9).
- Zhang, Z, M Chopp, A Goussev, and C Powers. 1998. "Cerebral Vessels Express Interleukin 1beta after Focal Cerebral Ischemia." *Brain Research* 784 (1–2): 210–17. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01317-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01317-6).
- Zhao, Y, and D A Rempe. 2010. "Targeting Astrocytes for Stroke Therapy." *Neurotherapeutics* 7 (4): 439–51. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.004>.
- Zielke, H R, P T Ozand, J T Tildon, D A Sevdalian, and M Cornblath. 1978. "Reciprocal Regulation of Glucose and Glutamine Utilization by Cultured Human Diploid Fibroblasts." *Journal of Cellular Physiology* 95 (1): 41–48. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040950106>.
- Zielke, H R, C L Zielke, and P J Baab. 2009. "Direct Measurement of Oxidative Metabolism in the Living Brain by Microdialysis: A Review." *J Neurochem* 109 Suppl: 24–29. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05941.x>.
- Zimmer, Eduardo R, Maxime J Parent, Débora G Souza, Antoine Leuzy, Clotilde Lecrux, Hyoung-Ihl Kim, Serge Gauthier, Luc Pellerin, Edith Hamel, and Pedro Rosa-Neto. 2017. "[18F]FDG PET Signal Is Driven by Astroglial Glutamate Transport." *Nature Neuroscience* 20 (3): 393–95. <https://doi.org/10.1038/nn.4492>.
- Zivin, J A. 1998. "Factors Determining the Therapeutic Window for Stroke." *Neurology* 50 (3): 599–603.
- Zoppo, G J del. 2009. "Inflammation and the Neurovascular Unit in the Setting of Focal Cerebral Ischemia." *Neuroscience* 158 (3): 972–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.028>.