



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Mauricio Tavares Jacques

**Estratégias experimentais para a modulação da ferroptose visando à proteção em
modelos de dano oxidativo neuronal *in vitro* e *in vivo***

Florianópolis

2022

Mauricio Tavares Jacques

**Estratégias experimentais para a modulação da ferroptose visando à proteção em
modelos de dano oxidativo neuronal *in vitro* e *in vivo***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica
Orientador: Prof. Marcelo Farina, Dr.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Jacques, Mauricio Tavares

Estratégias experimentais para a modulação da ferroptose visando à proteção em modelos de dano oxidativo neuronal in vitro e in vivo / Mauricio Tavares Jacques ; orientador, Marcelo Farina, 2022.

161 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Ferroptose. 3. Acidente vascular cerebral isquêmico. 4. Probucol. 5. Ativação microglial. I. Farina, Marcelo . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Mauricio Tavares Jacques

**Estratégias experimentais para a modulação da ferroptose visando à proteção
em modelos de dano oxidativo neuronal *in vitro* e *in vivo***

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Emilio Luiz Streck, Dr.

Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof. Jamil Assreuy, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo Bainy Leal, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Marcelo Farina, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022.

Dedico essa tese ao meu avô Elcy Tavares. Dedico também ao meu pai Victor Hugo, minha mãe Elizabeth, meu irmão, minha avó, e a Bruna. Todos trouxeram mais cores para minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente minha família, meu pai, minha mãe, meu irmão e meus avós por todo o suporte, convivência e amor dos últimos 30 anos. Agradeço enormemente ao meu avô por ter sido parte da minha vida.

Agradeço igualmente a Bruna, por todo amor, amizade e apoio. Por estar presente, de alguma forma, em todos os momentos e situações que ocorreram desde que nos conhecemos.

Agradeço ao Prof. Marcelo Farina por me receber na UFSC, pelas atenciosas orientações e conselhos, e principalmente por desempenhar um papel ativo e participativo em minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço a Prof.^a Daiana Ávila por todas as orientações na iniciação científica e mestrado, e por ter sido a ponte entre UNIPAMPA e UFSC.

Agradeço a Prof.^a Dirleise Colle por ter me ensinado os protocolos de imunohistoquímica.

Agradeço a Glorister por ter me ensinado os protocolos de cultura celular e por ter me ajudado logo que cheguei na UFSC.

Agradeço a banca examinadora pela disponibilidade, atenção e dedicação ao corrigir esta tese.

Agradeço a todos os animais que foram utilizados nos experimentos desta tese.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC) por fornecer a infraestrutura necessária para a realização desta tese.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela bolsa de doutorado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta tese.

Por fim, agradeço a ciência e aos colegas cientistas.

RESUMO

A homeostase do cérebro de mamíferos é mantida por um arranjo complexo de tipos celulares heterogêneos que orquestram o metabolismo e a neurotransmissão. Tal equilíbrio é comumente perturbado em condições neuropatológicas crônicas, tais como doenças de Parkinson e Alzheimer, e condições agudas, como o acidente vascular cerebral isquêmico. Estas condições têm a neuroinflamação e o estresse oxidativo como mecanismos centrais, sendo o último recentemente ligado a uma nova forma oxidativa de morte celular chamada ferroptose. Neste trabalho, propusemos duas estratégias experimentais em modelos distintos, que objetivaram reduzir a morte neuronal causada pela ferroptose. A primeira investigou se um análogo inédito do probucol, 4,4'-Diselanedilbis (2,6-di-*tert*-butilfenol) ou **C2**, o qual demonstrou propriedades anti-ferroptóticas *in vitro*, seria capaz de induzir efeitos protetores em um cenário fisiopatológico *in vivo* de dano oxidativo e ferroptótico. Para isto, ratos Wistar adultos foram submetidos a um acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico focal experimental por meio de injeções centrais do vasoconstritor endotelina-1 (ET-1; 800 pmol/sítio). O composto **C2** foi selecionado com base em sua baixa toxicidade *in vivo*, sendo administrado (20 e 50 mg/kg, i.p.) em 1, 24, 48 e 72 h após a administração de ET-1. Realizaram-se testes comportamentais relacionados ao desempenho motor (teste de remoção do adesivo, teste de equilíbrio em feixe e teste do cilindro) no dia 5 após a indução da isquemia. Após os testes comportamentais, todos os animais foram perfundidos e os cérebros coletados para análises imunohistoquímicas da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Os animais que receberam apenas ET-1 tiveram significativo comprometimento motor e sensorial, e gliose reativa. Em contraste, animais tratados com ET-1 + **C2** mostraram recuperação significativa dos prejuízos motores e sensoriais induzidos por ET-1, além de redução da gliose reativa. Em um modelo *in vitro* utilizando cultivos celulares, investigamos o potencial protetor inexplorado dos produtos da ativação microglial contra um dano ferroptótico induzido por glutamato em células neuronais HT22. Cultivos de células microgliais (BV-2) foram estimulados com 5-100 ng/mL lipopolissacarídeo (LPS) por 24 h e, após confirmação da ativação microglial, seu meio de cultura (meio condicionado; MC) foi transferido para células neuronais HT22, as quais foram posteriormente (6 h depois) expostas a altas concentrações de glutamato (modelo clássico de ferroptose) ou *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BuOOH). Como achado principal, as células HT22 pré-tratadas por 6 h com MC derivado de células BV-2 estimuladas com LPS exibiram significativa resistência à ferroptose, caracterizada pela diminuição da sensibilidade à citotoxicidade induzida por glutamato (15 mM). No entanto, não foram observados efeitos protetores significativos do MC em células desafiadas com *t*-BuOOH (30 μ M). Esses resultados indicam que moléculas derivadas de micróglia ativas podem proteger as células neuronais contra a ferroptose induzida pelo glutamato, mas não contra outros danos de natureza oxidativa, como os induzidos pelo *t*-BuOOH. Nosso trabalho destacou os produtos da ativação microglial e o promissor análogo **C2** como inibidores da morte celular ferroptótica, trazendo novas possibilidades para o tratamento ou melhora da qualidade de vida de pacientes que sofreram AVC isquêmico.

Palavras-chave: AVC isquêmico. Endotelina-1. Probucol. Meio condicionado. Ferroptose.

ABSTRACT

Mammalian brain homeostasis is maintained by a complex array of heterogeneous cell types that orchestrate metabolism and neurotransmission. Such balance is commonly disturbed in chronic neuropathological conditions, such as Parkinson's and Alzheimer's diseases, and acute conditions, such as ischemic stroke. These conditions have neuroinflammation and oxidative stress as central mechanisms, the latter being recently linked to a new oxidative form of cell death called ferroptosis. In this work, we proposed two experimental strategies in different models, which aimed to reduce neuronal death caused by ferroptosis. The first investigated whether a novel probucol analogue, 4,4'-Diselanediybis (2,6-di-tert-butylphenol) or **C2**, which demonstrated anti-ferroptotic properties *in vitro*, would be able to induce protective effects in a pathophysiological scenario of oxidative and ferroptotic damage *in vivo*. For this, adult Wistar rats were submitted to an experimental focal ischemic stroke via central injections of the vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1; 800 pmol/site). Compound **C2** was selected on the basis of its low toxicity *in vivo*, being administered (20 and 50 mg/kg, i.p.) at 1, 24, 48 and 72 h after ET-1 administration. Behavioral tests related to motor performance (adhesive removal test, beam balance test and cylinder test) were performed on day 5 after induction of ischemia. After behavioral tests, all animals were perfused and brains collected for immunohistochemical analysis of glial fibrillary acidic protein (GFAP). Animals that received only ET-1 had significant motor and sensory impairment, and reactive gliosis. In contrast, animals treated with ET-1 + **C2** showed significant recovery from ET-1-induced motor and sensory impairments, in addition to a reduction in reactive gliosis. In an *in vitro* model using cell cultures, we investigated the unexplored protective potential of microglial activation products against glutamate-induced ferroptotic damage in HT22 neuronal cells. Microglial cell cultures (BV-2) were stimulated with 5-100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) for 24 h and, after confirmation of microglial activation, their culture medium (conditioned medium; CM) was transferred to HT22 neuronal cells, which were later (6 h later) exposed to high concentrations of glutamate (classical model of ferroptosis) or tert-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH). As a main finding, HT22 cells pretreated for 6 h with CM derived from LPS-stimulated BV-2 cells exhibited significant resistance to ferroptosis, characterized by decreased sensitivity to glutamate-induced cytotoxicity (15 mM). However, no significant protective effects of CM were observed in cells challenged with *t*-BuOOH (30 μ M). These results indicate that molecules derived from activated microglia can protect neuronal cells against glutamate-induced ferroptosis, but not against other oxidative damage, such as those induced by *t*-BuOOH. Our work highlighted the products of microglial activation and the promising **C2** analogue as inhibitors of ferroptotic cell death, bringing new possibilities for the treatment or improvement of the quality of life of patients who have suffered ischemic stroke.

Keywords: Ischemic stroke. Endothelin-1. Probucol. Conditioned medium. Ferroptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eventos moleculares iniciados no tecido cerebral pelo AVC isquêmico.	17
Figura 2 – Representação da evolução do núcleo isquêmico.....	18
Figura 3 – Metabolismo humano do ferro e a ferroptose.....	21
Figura 4 – Eliminação de peróxidos lipídicos pela GPX4.	27
Figura 5 – Peroxidação lipídica na ferroptose.....	29
Figura 6 – Perfis clássicos de ativação microglial durante um AVC isquêmico.	31
Figura 7 – Diferenças morfológicas em astrócitos dependendo do grau da lesão no AVC isquêmico.....	33
Figura 8 – Aparelho estereotáxico e pontos de referência.	35
Figura 9 – Vias regulatórias que levam a inibição da GPX4.	37
Figura 10 – Novos análogos do probucol.....	39
Figura 11 – Desenho experimental.....	42
Figura 12 – Desempenho dos animais no teste do cilindro.....	51
Figura 13 – Desempenho dos animais no teste do equilíbrio em feixe.....	52
Figura 14 – Desempenho dos animais do teste da remoção do adesivo.....	54
Figura 15 – Imagens representativas e quantificação de astrócitos GFAP positivos..	56
Figura 16 – Efeitos do LPS na liberação de nitrito e na viabilidade e morte celular de culturas microgliais BV-2.	58
Figura 17 – Efeito do LPS e MC na viabilidade e morte celular de culturas neuronais HT22.....	59
Figura 18 – Efeitos do glutamato e <i>t</i> -BuOOH na viabilidade e morte celular de culturas neuronais HT22	61
Figura 19 – Efeitos do MC na proteção contra a citotoxicidade induzida por glutamato e <i>t</i> -BuOOH em culturas neuronais HT22.....	63

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Diferenças morfológicas e bioquímicas dos principais tipos de morte celular. 19
- Quadro 2 – Pesquisas evidenciando a possível presença de ferroptose no AVC isquêmico....23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BCL-2 – B-cell lymphoma-2 (Linfoma de células B-2)
- ANOVA – Análise de Variância
- AP – Anteroposterior
- ATP – Adenosine Triphosphate (Trifosfato de Adenosina)
- AVC – Acidente Vascular Cerebral
- DAMPs – Damage-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Danos)
- DCF – 2',7'-diclorofluoresceína
- DCFH-DA – 2',7'-Dicloro-Dihidro-Fluoresceína Diacetato
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- DMT-1 – Divalent metal transporter-1 (Transportador Tipo Metal Bivalente-1)
- DPPH – 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil
- DV - Dorsoventral
- EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- ET-1 – Endotelina-1
- FPN – Ferroportina
- GCL – Glutamato Cisteína Ligase
- GPX4 – Glutathione Peroxidase 4
- GR – Glutathione Redutase
- GSH – Glutathione Reduzida
- GSSG – Glutathione Oxidada
- HBSS – Hank's Balanced Salt Solution
- HCP-1 – Heme Carrier Protein-1 (Proteína Transportadora de Heme-1)
- HDL – High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)
- ICAD – Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease (Inibidor da Desoxirribonuclease Ativada por Caspase)
- IFN- γ – Interferon- γ
- IGF-1 – Insulin-like Growth Factor 1 (Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1)
- iNOS – Inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido Nítrico Sintase Induzível)
- IL – Interleucina
- IP – Iodeto de Propídeo

LC3 – Microtubule-associated protein light chain 3 (Cadeia leve de proteína associada a microtúbulos 3)

LOX – Lipoxigenase

LPS – Lipopolissacarídeo

MC – Meio Condicionado

MCAO – Middle Cerebral Artery Occlusion (Oclusão da Artéria Cerebral Média)

ML – Mediolateral

MLKL – Mixed lineage kinase domain like pseudokinase (Domínio quinase de linhagem mista do tipo pseudoquinase)

MMP – Matrix metalloproteinase (metaloproteinase da matriz)

MTT – 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida

NMDA – N-metil-D-aspartato

NPSH – Non Protein Thiol (Tióis Não Proteicos)

PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

PARP – Poli (ADP-Ribose) Polimerase

PL – Phospholipid (Fosfolipídio)

PUFAs – Polyunsaturated Fatty Acids (Ácidos Graxos Poliinsaturados)

RIPK1 – Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (serina/treonina-proteína quinase 1 que interage com o receptor)

RIPK3 – Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (serina/treonina-proteína quinase 3 que interage com o receptor)

t-BuOOH – *tert*-Butil Hidroperóxido

TFR1 – Transferrina tipo 1

TRF2 – Transferrina tipo 2

TGF – Transforming Growth Factor (Fator de Crescimento Transformador)

TLR – Toll-like receptor (Receptor tipo Toll)

TNF- α – Tumour Necrosis Factor- α (Fator de Necrose Tumoral- α)

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+} – Cálcio

Fe^{2+} – Íon ferroso

Fe^{3+} – Íon férrico

H_2O – Água

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

NO – Óxido nítrico

O_2 – Oxigênio molecular

$\text{OH}\cdot$ - - Radical hidroxila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	O acidente vascular cerebral isquêmico (avc)	15
1.2	Ferroptose e o avc isquêmico.....	18
1.2.1	Ferro, ferroptose e o AVC isquêmico	20
1.2.2	Peroxidação lipídica, ferroptose e o AVC isquêmico	22
1.3	Micróglias, Astrócitos e neuroinflamação pós-AVC isquêmico	30
1.4	Modelo experimental <i>in vivo</i> de avc isquêmico induzido por endotelina-1 (et-1)	33
1.5	O modelo da ferroptose em células ht22	36
1.6	Considerações	37
2	Justificativa	39
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos Específicos	40
4	METODOLOGIA.....	41
4.1	Metodologia do estudo <i>in vivo</i>	41
4.1.1	Químicos/reagentes.....	41
4.1.2	Animais	41
4.1.3	Cálculo do tamanho amostral e número experimental	42
4.1.4	Avaliação preliminar toxicológica.....	43
4.1.5	Protocolo da isquemia focal (procedimentos cirúrgicos)	43
4.1.6	Tratamento pós-isquêmico.....	44
4.1.7	Testes comportamentais.....	44
<i>4.1.7.1</i>	<i>Teste do cilindro</i>	<i>44</i>
<i>4.1.7.2</i>	<i>Teste do equilíbrio em feixe.....</i>	<i>45</i>
<i>4.1.7.3</i>	<i>Teste da remoção do adesivo.....</i>	<i>45</i>
4.1.8	Processamento amostral.....	46

4.1.9	Análises imunohistoquímicas.....	46
4.1.10	Análise estatística.....	46
4.2	Metodologia do estudo <i>in vitro</i>	47
4.2.1	Químicos/reagentes.....	47
4.2.2	Culturas celulares	47
4.2.3	Produção do meio condicionado e ensaio do oxido nítrico	48
4.2.4	Protocolos de exposição à glutamato e <i>t</i> -BuOOH em células HT22.....	48
4.2.5	Protocolo de exposição ao MC em células HT22	48
4.2.6	Ensaio da viabilidade metabólica celular	49
4.2.7	Ensaio da morte celular.....	49
4.2.8	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Resultados do estudo <i>in vivo</i>	50
5.1.1	<i>C2</i> recuperou a assimetria de uso do membro anterior induzida por ET-1... 50	50
5.1.2	<i>C2</i> recuperou o comprometimento do equilíbrio induzido por ET-1	51
5.1.3	Efeitos de <i>C2</i> no déficit sensório-motor induzido por ET-1.....	53
5.1.4	<i>C2</i> inibiu a gliose reativa induzida por ET-1	54
5.2	Resultados do estudo <i>in vitro</i>	57
5.2.1	LPS não é citotóxico e induz ativação microglial.....	57
5.2.2	LPS e MC não foram citotóxicos em células HT22	59
5.2.3	Glutamato e <i>t</i> -BuOOH induziram uma citotoxicidade dependente da concentração em células HT22	60
5.2.4	MC derivado de células microgliais estimuladas por LPS protegeu contra a ferroptose induzida por glutamato, mas não contra a toxicidade oxidativa induzida por <i>t</i> -BuOOH em células HT22	61
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

APÊNDICE A – Material suplementar	87
APÊNDICE B – Manuscrito 1	97
APÊNDICE C – Manuscrito 2.....	138

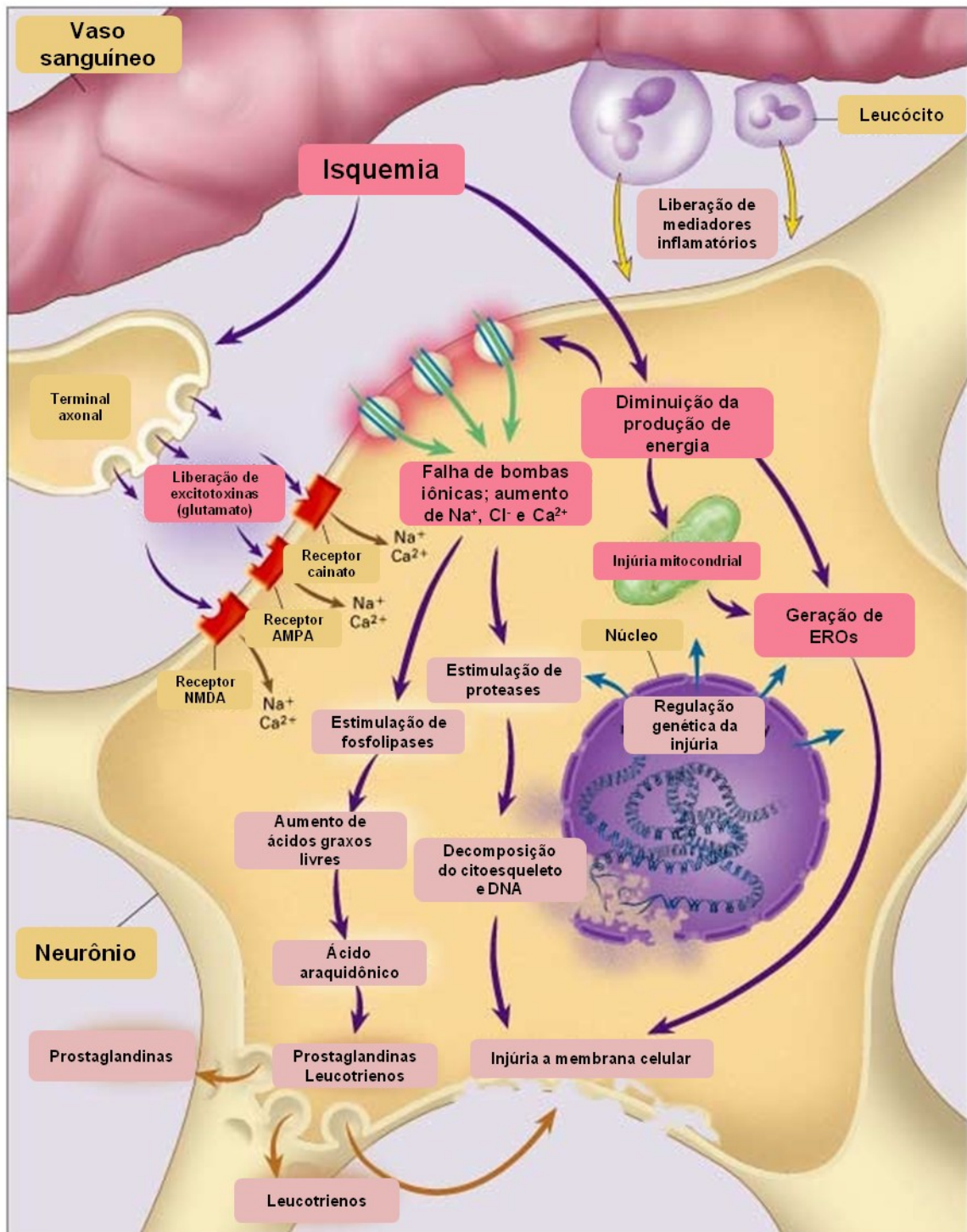
1 INTRODUÇÃO

1.1 O ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO (AVC)

O AVC isquêmico, caracterizado pela interrupção do fluxo sanguíneo para uma parte do cérebro, representa uma condição devastadora que consome vidas humanas e incapacita seus sobreviventes. É a segunda principal causa de morte, sendo responsável por 10% de todas as mortes no mundo, representando aproximadamente 5,5 milhões de vidas perdidas anualmente (COLLABORATORS *et al.*, 2018; KAJI, 2019; NAGHAVI *et al.*, 2017). O AVC também é a principal causa de incapacidade no mundo e cerca de um terço de seus sobreviventes sofrerá de sequelas neuropsiquiátricas, como depressão e ansiedade (FERRO; CAEIRO; FIGUEIRA, 2016; TOWFIGHI *et al.*, 2017). Quando o AVC é causado pela oclusão de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, leva a um infarto tecidual focal (cérebro, medula espinhal ou retina), é chamado de AVC isquêmico (CAMPBELL *et al.*, 2019; SACCO *et al.*, 2013). O AVC isquêmico é o tipo mais comum de AVC, representando aproximadamente 70% de todos os casos relatados (CAMPBELL *et al.*, 2019; COLLABORATORS *et al.*, 2018). O bloqueio do fluxo sanguíneo é causado principalmente por eventos tromboembólicos; aterosclerose de grandes artérias e doenças cardíacas são exemplos de fontes comuns de embolia (CAMPBELL *et al.*, 2019). A principal estratégia de tratamento farmacológico é a terapia de reperfusão com trombólise intravenosa: alteplase, uma forma recombinante do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) (POWERS, 2020). A terapia com alteplase é considerada um padrão trombolítico, sendo licenciada para o acidente vascular cerebral isquêmico em todo o mundo; no entanto, a maioria dos pacientes não é elegível para seu uso, pois os resultados positivos são observados apenas em uma janela terapêutica curta e contrastam com os riscos de complicações hemorrágicas (CAMPBELL *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2017; YAGHI *et al.*, 2017). Adicionalmente, a terapia antiplaquetária com uso de aspirina pode reduzir as chances de um AVC recorrente e melhorar o desfecho, mas o uso dessa terapia apresenta menos benefícios do que a terapia de reperfusão (CAMPBELL *et al.*, 2019). Embora sejam as principais abordagens farmacológicas, não devem ser interpretadas como tratamentos ideais. Ao contrário, denunciam explicitamente a falta de terapias medicamentosas eficazes e aprovadas contra o AVC isquêmico. Uma das razões que sustentam essa realidade é a complexidade dos processos neurobiológicos que ocorrem em um acidente vascular cerebral isquêmico (CAMPBELL *et al.*, 2019).

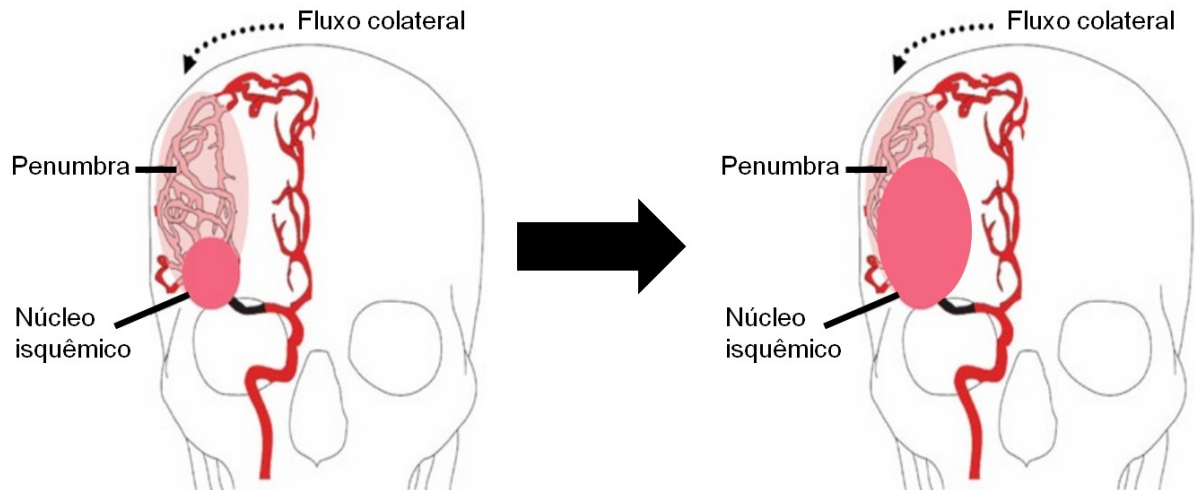
A crise bioenergética celular desencadeada pela hipoperfusão cerebral focal é o primeiro passo para a morte celular, originando uma série de consequências neuroquímicas que se desenvolvem subordinadas ao tempo; essas respostas bioquímicas são conhecidas como cascata isquêmica, e envolvem mecanismos como excitotoxicidade glutamatérgica, inflamação, injúria mitocondrial, geração de radicais livres e peroxidação lipídica (Figura 1) (BROTT; BOGOUSSLAWSKY, 2000; IADECOLA; ANRATHER, 2011). Como o acidente vascular cerebral isquêmico compromete o fornecimento de oxigênio e glicose às células, o tecido cerebral é particularmente vulnerável a essa condição, devido à sua alta demanda por essas moléculas durante o metabolismo aeróbico. Consequentemente, o dano de uma região cerebral infartada está relacionado à extensão e duração da restrição sanguínea (BROUNS; DE DEYN, 2009). Em regiões com severa restrição sanguínea, o dano rapidamente se torna irreversível, criando uma zona além do resgate terapêutico denominada núcleo isquêmico (MOUSTAFA; BARON, 2008). Entre o núcleo isquêmico e o tecido cerebral normal (não afetado) existe a penumbra isquêmica, uma área que sofreu uma isquemia menos grave e, portanto, potencialmente recuperável, mas que é progressivamente danificada pelos insultos da cascata isquêmica (Figura 2) (BROUNS; DE DEYN, 2009; WOODRUFF *et al.*, 2011). Nessa complexa série de eventos, um dos mecanismos fisiopatológicos preocupantes é o estresse oxidativo. Durante um acidente vascular cerebral isquêmico, a consequente despolarização anóxica dos neurônios leva à liberação de neurotransmissores, principalmente glutamato (TYMIANSKI, 2011). O acúmulo extracelular de glutamato leva a uma hiperativação dos receptores NMDA, o que resulta em um influxo aberrante de cálcio (YOO *et al.*, 2017). A desregulação da homeostase do Ca^{2+} desencadeia eventos nucleares e citoplasmáticos, que acabam por levar à produção de radicais livres, estresse oxidativo e morte celular (BROUNS; DE DEYN, 2009; MEHTA *et al.*, 2013; YOO *et al.*, 2017). Além desses eventos excitotóxicos, vale ressaltar que o excesso de glutamato também pode causar oxitose (toxicidade oxidativa do glutamato), indistinguível da ferroptose, um tipo de morte celular recentemente descrito (DIXON *et al.*, 2012).

Figura 1 – Eventos moleculares iniciados no tecido cerebral pelo AVC isquêmico.



A figura mostra esquematicamente eventos iniciados após a despolarização anóxica induzida pelo AVC isquêmico, como excitotoxicidade glutamatérgica, inflamação, injúria mitocondrial, geração de radicais livres e peroxidação lipídica. Fonte: adaptado de (BROTT; BOGOUSLAVSKY, 2000).

Figura 2 – Representação da evolução do núcleo isquêmico.



A figura destaca esquematicamente o núcleo isquêmico e a penumbra (esquerda). Caso o fluxo sanguíneo não seja restaurado há um progressivo aumento do núcleo isquêmico e uma diminuição da penumbra resgatável (direita). Fonte: adaptado de (GONZÁLEZ, 2006).

1.2 FERROPTOSE E O AVC ISQUÊMICO

A ferroptose, uma forma recentemente descrita de morte celular regulada, é caracterizada pela perda de controle sobre o metabolismo do ferro, depleção de antioxidantes, inatividade da glutathione peroxidase 4 (GPX4) e subsequente letal peroxidação lipídica (DIXON et al., 2012). Interessantemente, características presentes na ferroptose, como depleção de glutathione, peroxidação lipídica e disfunção mitocondrial, também estão presentes no envelhecimento, doenças de Alzheimer e Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e no acidente vascular cerebral isquêmico, tornando a exploração e modulação desta via um possível alvo terapêutico (MAHER; CURRAIS; SCHUBERT, 2020; YAN *et al.*, 2021).

A ferroptose é bioquimicamente e morfológicamente distinta de outras mortes celulares reguladas, por exemplo, ocorre sem a condensação de cromatina e a redução nuclear vistas na apoptose; o inchaço celular e organelar da necrose também não é reportado (REICHERT et al., 2020). Morfológicamente, na ferroptose é possível apenas observar o encolhimento mitocondrial, como uma característica distinta das outras mortes celulares. O Quadro 1 traz as principais características morfológicas e bioquímicas de diferentes tipos de morte celular (REICHERT et al., 2020).

Quadro 1 – Diferenças morfológicas e bioquímicas dos principais tipos de morte celular.

Morte celular	Características morfológicas e bioquímicas
Apoptose	<p>Fragmentação nuclear, bolhas/pregas na membrana plasmática, encolhimento celular (picnose), formação de corpos apoptóticos e fagocitose por células vizinhas.</p> <p>Membros da família BCL-2 (do inglês <i>B-cell lymphoma-2</i>) pró-apoptóticos, ativação de caspase, clivagem de substratos de caspase, por exemplo, ICAD (do inglês <i>inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease</i>), PARP [do inglês <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>] e produção de espécies reativas de oxigênio.</p>
Necroptose	<p>Inchaço citoplasmático (oncoses), perda da integridade da membrana plasmática, inchaço das organelas citoplasmáticas.</p> <p>RIPK1 (do inglês <i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>), RIPK3 (do inglês <i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>), MLKL (do inglês <i>mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>), fosforilação e ubiquitinação de RIPK1, formação do complexo necrossoma no citosol, fosforilação e ativação de MLKL, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de DAMPs (do inglês <i>damage-associated molecular patterns</i>), e em células infectadas também PAMPs (do inglês <i>pathogen-associated molecular patterns</i>).</p>
Autofagia	<p>Acúmulo de vacúolos autofágicos, vacuolização do citoplasma, ausência de condensação da cromatina.</p> <p>Família atg de proteínas codificadas por genes, conversão de LC3-I (do inglês <i>microtubule-associated protein light chain 3</i>) em LC3-II e clivagem de p62.</p>
Ferropoptose	<p>Mitocôndrias menores com cristas diminuídas, densidade aumentada e ruptura da membrana mitocondrial, mas com núcleo normal.</p> <p>Acúmulo de ferro, privação de cisteína e/ou inativação da glutatona peroxidase 4 culminando em peroxidação lipídica.</p>
Piroptose	<p>Ruptura da membrana plasmática e ausência de edema celular.</p> <p>Ativação inflamatória induzida das caspases iniciadoras, caspase-1 e -11, e consequente ativação das caspases efetoras, caspase-3 e -1. Liberação de interleucinas bioativas (IL-1β e IL-18) e ativação proteolítica de GSDMD (gasdermina D), o efetor essencial da piroptose.</p>
Necrose	<p>Ruptura da membrana plasmática, inchaço das organelas citoplasmáticas, falta de fragmentação do DNA internucleossômico, depleção de ATP, envolvimento de calpaínas e catepsinas, liberação de DAMPs, e em células infectadas também PAMPs.</p>

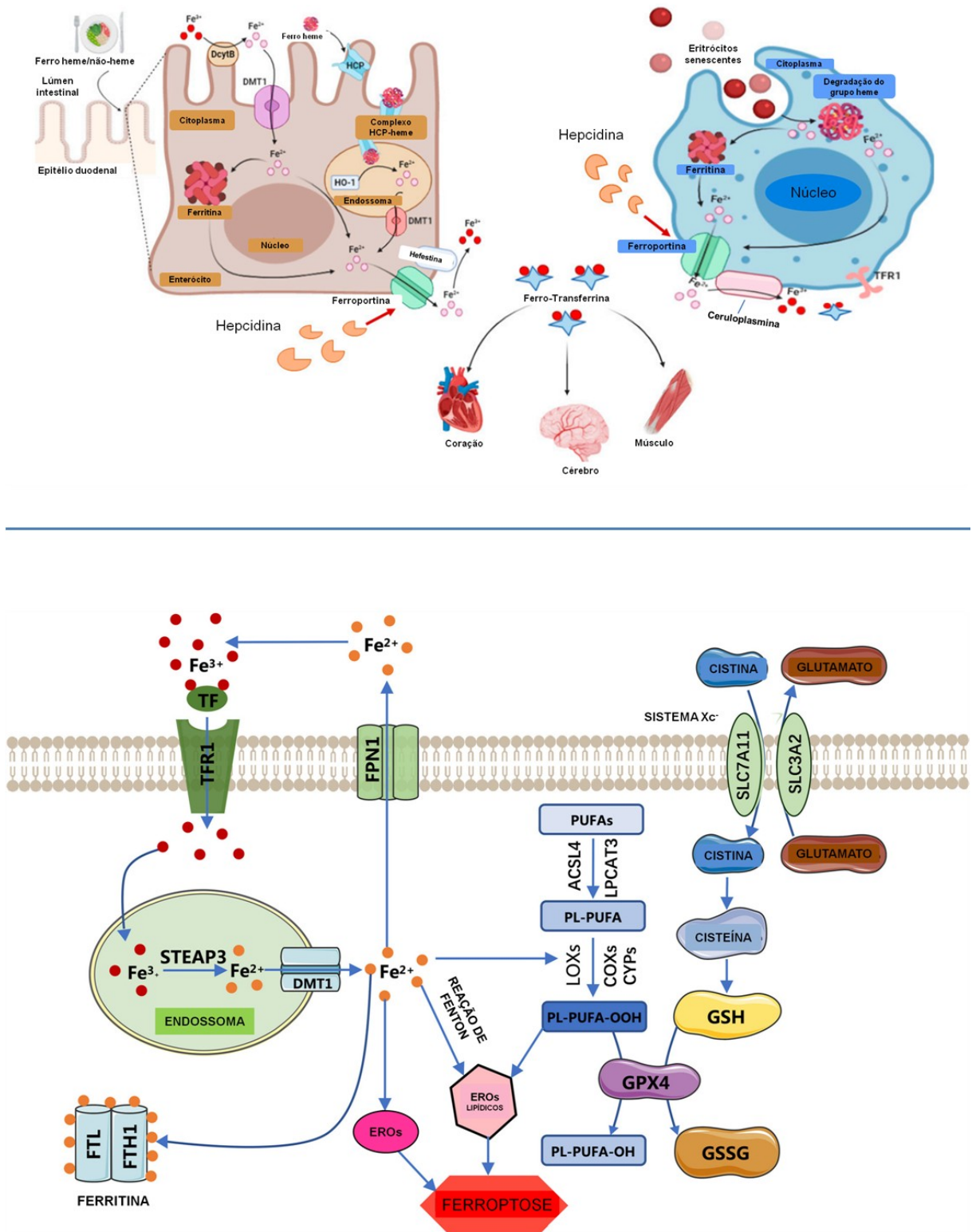
Fonte: adaptado de (MOUJALLED; STRASSER; LIDDELL, 2021)

A morte celular na ferroptose é governada por dois fatores principais: aumento do ferro intracelular livre e a peroxidação lipídica devido à perturbação das defesas antioxidantes (REICHERT *et al.*, 2020).

1.2.1 Ferro, ferroptose e o AVC isquêmico

Como o nome sugere, a morte celular ferroptótica depende de ferro. O fornecimento de ferro ao organismo humano pode vir da dieta ou reciclagem de eritrócitos senescentes (LANE *et al.*, 2015). No duodeno e na porção proximal do jejuno ocorre a absorção de ferro ferroso (Fe^{2+} ; ferro heme) e ferro férrico (Fe^{3+} ; não heme) pelos enterócitos (REICHERT *et al.*, 2020). De nota, é necessário reduzir o ferro férrico a ferroso, por meio de enzimas como a enzima duodenal citocromo b (Dcytb) (LANE *et al.*, 2015). Posteriormente, o ferro ferroso é transportado pelo transportador tipo metal bivalente-1 (DMT-1) e armazenado dentro da célula (INGRASSIA *et al.*, 2012). Como ilustrado na Figura 3, o ferro ferroso da dieta é internalizado pela proteína transportadora de heme-1 (HCP-1), onde é armazenado como hemossiderina e/ou ferritina, para evitar a reação de Fenton. Quando os níveis séricos de ferro estão baixos, tais armazenamentos de ferro intracelulares são mobilizados para o meio extracelular pela ferroportina (FPN), esse processo é regulado negativamente pela hepcidina (GANZ, 2008; SŁOMKA; ŚWITOŃSKA; ŻEKANOWSKA, 2015). Contudo, o ferro é liberado em seu estado ferroso, precisando ser oxidado a ferro férrico e ligado a transferrina (apotransferrina) sérica para poder ser transportado pelo corpo, dando origem à holotransferrina (GANZ, 2008). A reação em que ferro ferroso é oxidado a férrico ocorre pela ação de enzimas oxidases: hefestina presente nos enterócitos, e ceruloplasmina presente nos hepatócitos e macrófagos (REICHERT *et al.*, 2020). Graças à endocitose da holotransferrina, o ferro pode ser distribuído e absorvido em outros tecidos, esse mecanismo é mediado pela ligação ao receptor de transferrina tipo 1 (TFR1) e tipo 2 (TFR2) (KAWABATA, 2019). O complexo holotransferrina-TFR1 é mobilizado para os endossomos, nos quais o ferro férrico é liberado da transferrina e convertido em ferro ferroso por oxidação-redução, pelo antígeno epitelial de seis transmembranas da próstata 3 (STEAP3) e então exportado para o citosol pelo transportador de metal divalente 1 (DMT-1) (REICHERT *et al.*, 2020). Por fim, o ferro pode ser armazenado em ferritina/hemossiderina ou permanecer lábil (KNUTSON, 2007).

Figura 3 – Metabolismo humano do ferro e a ferroptose.



A figura ilustra esquematicamente as informações discutidas no item 1.2.1. Painel superior resume os eventos ligados a absorção e distribuição do ferro no organismo humano. Enquanto que o painel inferior relaciona a formação do ferro lábil com a ferroptose. Fonte: adaptado de (LIU *et al.*, 2022; REICHERT *et al.*, 2020).

O ferro lábil é composto principalmente de Fe^{2+} e pode estar presente nas mitocôndrias, lisossomos, citosol e núcleo (LV; SHANG, 2018). O ferro lábil é altamente reativo, podendo catalisar a formação de radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) derivados do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da reação de Fenton (GALARIS; BARBOUTI; PANTOPOULOS, 2019). Os radicais livres (hidroxila e hidroperoxila) gerados pela reação de Fenton oferecem significativo potencial citotóxico, pois devido a sua alta reatividade podem danificar moléculas biológicas, como proteínas e DNA, além de serem capazes de iniciar a peroxidação de lipídios, característica chave na ferroptose (JIANG; STOCKWELL; CONRAD, 2021; YANG; STOCKWELL, 2016). Interessantemente, a glutatona tem uma alta afinidade com o Fe^{2+} , sendo que o *pool* de ferro lábil no citosol é constituído principalmente de conjugados glutatona- Fe^{2+} (LV; SHANG, 2018). Esse fato torna-se relevante no contexto patológico, pois a diminuição da glutatona intracelular, característica da ferroptose, aumenta a concentração de Fe^{2+} , que pode facilitar a reação de Fenton e a peroxidação lipídica, visto que a diminuição dos níveis de glutatona impacta diretamente a atividade da GPX4, enfraquecendo as defesas antioxidantes (HIDER; KONG, 2013; LV; SHANG, 2018; YANG; STOCKWELL, 2016).

A falha na captação, transporte, armazenamento e utilização do ferro intracelular resultará no excesso e deposição de Fe^{2+} (XU *et al.*, 2020). Logo, a homeostase do ferro é essencial para o funcionamento do cérebro; contudo, diante de um AVC isquêmico esse equilíbrio é perturbado, resultando em uma sobrecarga de ferro (XU *et al.*, 2022). De fato, foi reportado que o conteúdo de ferro está aumentado em cérebros isquêmicos (DING *et al.*, 2011; TUO *et al.*, 2017). Adicionalmente, foi reportado que animais com sobrecarga de ferro foram mais afetados pela oclusão da artéria cerebral média (MCAO) (CASTELLANOS *et al.*, 2002), enquanto a quelação ou depleção de ferro reduziu a lesão cerebral induzida por isquemia/reperfusão (PALMER; ROBERTS; BERO, 1994; PATT *et al.*, 1990). Por fim, foi observado que um armazenamento elevado de ferro se correlaciona com um prognóstico ruim em pacientes que sofreram AVC isquêmico agudo (MILLAN *et al.*, 2007). Estudos evidenciando a relação entre o metabolismo do ferro e o AVC isquêmico foram destacados no Quadro 2.

1.2.2 Peroxidação lipídica, ferroptose e o AVC isquêmico

A fisiopatologia do AVC isquêmico é complexa, envolvendo processos que se desenvolvem por meio de mecanismos como excitotoxicidade, inflamação, apoptose e

estresse oxidativo (TUO *et al.*, 2017). A progressão do dano isquêmico pode ser atribuída ao estresse oxidativo (SHE *et al.*, 2020). Um cérebro isquêmico possui mais espécies reativas do que pode detoxificar, com suas defesas antioxidantes enfraquecidas, o aumento oportunista dos radicais livres resulta, entre outras consequências, na peroxidação descontrolada de lipídios e proteínas, e morte celular (OLMEZ; OZYURT, 2012; SHE *et al.*, 2020; WOODRUFF *et al.*, 2011). Características da ferroptose, como descontrole do metabolismo do ferro, estresse oxidativo e intensa peroxidação lipídica também estão presentes no AVC isquêmico (Quadro 2).

Quadro 2 – Pesquisas evidenciando a possível presença de ferroptose no AVC isquêmico.

Mecanismo relacionado à ferroptose	Alvo investigado	Organismo	Resultados	Referências
Metabolismo do ferro	Acumulação de ferro	Humanos	Encontrado em regiões isquêmicas e tecido cerebral de pessoas idosas.	(VALDÉS HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2019)
	Ferritina (soro)	Humanos	Níveis mais altos indicam pior prognóstico após AVC isquêmico agudo.	(DÁVALOS <i>et al.</i> , 1994; MILLÁN <i>et al.</i> , 2008; MILLAN <i>et al.</i> , 2007)
	Transferrina (soro)	Humanos	Níveis mais altos indicam menor risco de AVC isquêmico.	(GILL <i>et al.</i> , 2018)
	Hepcidina (plasma)	Humanos	Níveis mais altos em pacientes com AVC isquêmico.	(SŁOMKA; ŚWITOŃSKA; ŻEKANOWSKA, 2015)
	Ceruloplasmina	Camundongos	Perda leva à ferroptose induzida pela deposição de	(RYAN <i>et al.</i> , 2019)

			ferro intracelular em modelo animal de AVC isquêmico.	
	Proteína tau	Camundongos	Pode induzir a exportação de ferro e inibir a ferroptose em modelo animal de AVC isquêmico.	(TUO <i>et al.</i> , 2017)
	1B/DMT1 (Transportador de metal bivalente 1, isoforma 1B)	Células SK-N-SH e Camundongos	Aumento de ferro através de 1B/DMT1 pode contribuir para o dano neuronal pós-isquêmico.	(INGRASSIA <i>et al.</i> , 2012)
	Ferritina mitocondrial	Camundongos	Atenua a ferroptose neuronal ao diminuir o pool de ferro lábil intracelular durante a lesão cerebral por I/R.	(WANG, P. <i>et al.</i> , 2021)
Estresse oxidativo	Genes mitocondriais	Humanos	Superexpressão do haplogrupo F mitocondrial, levando a diminuição da função mitocondrial, como fator de risco para AVC isquêmico.	(TSAI <i>et al.</i> , 2020)
	NADPH oxidase 2 e MiR-532-3p (MicroRNA)	Células SH-SY5Y e Ratos	Aumento de NADPH oxidase 2 em tecidos cerebrais submetidos a isquemia/reperfusão e em células SH-SY5Y submetidas a H/R, enquanto a expressão de miR-532-3p foi	(MAO <i>et al.</i> , 2020)

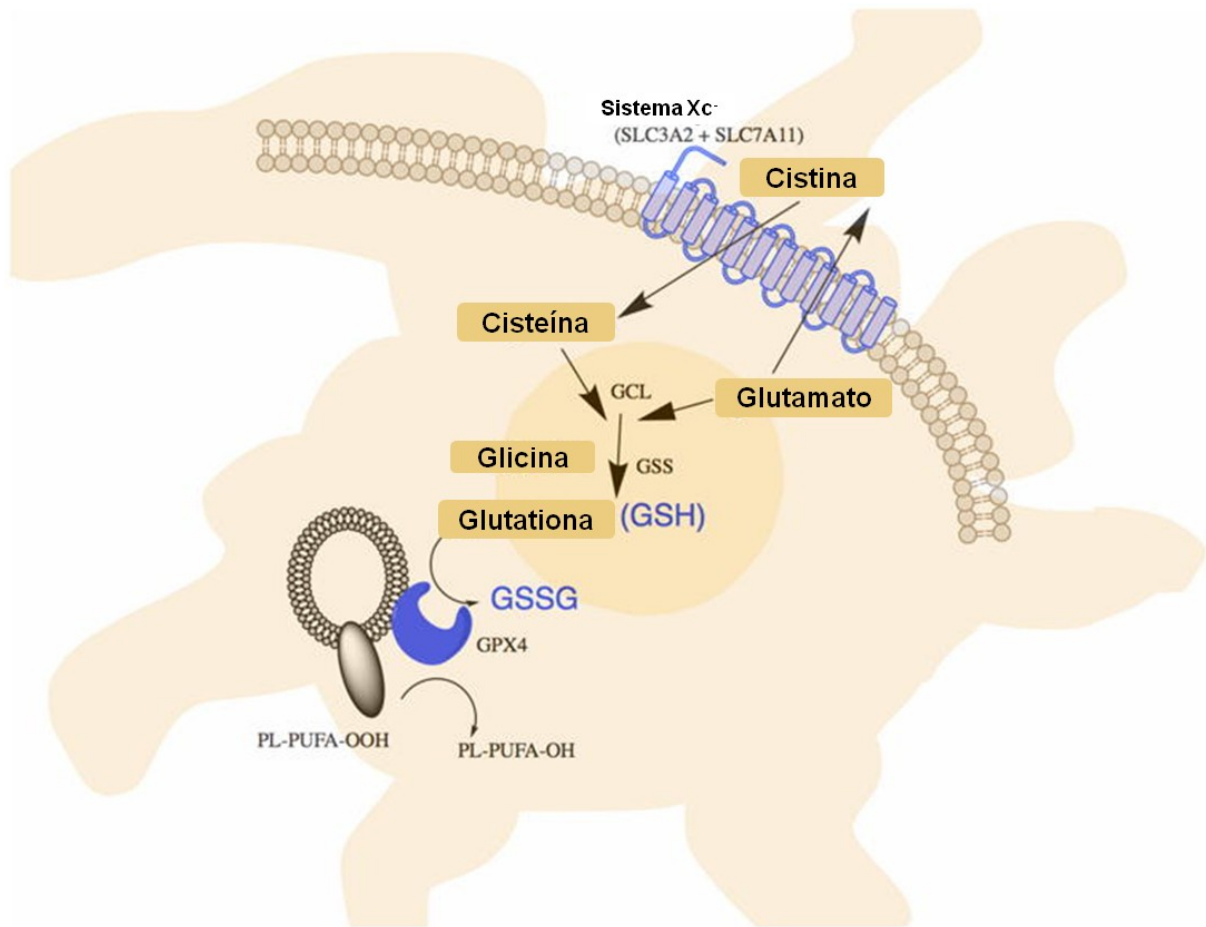
			diminuída em tecidos cerebrais e plasma.	
	Sistema antioxidante	Células PC12 e Ratos	Composto sintético diminuiu espécies reativas de oxigênio e restaurou o potencial de membrana mitocondrial. Recuperou o déficit comportamental, diminuiu o tamanho do infarto cerebral e níveis de citocinas em modelo animal de AVC isquêmico.	(LIAO <i>et al.</i> , 2020)
Peroxidação lipídica	Indução de peroxidação	Ratos	Composto sintético diminuiu intensa peroxidação lipídica induzida por modelo de oclusão permanente da artéria cerebral média.	(MOHSIN ALVI <i>et al.</i> , 2020)
	TLR4 (receptor do tipo Toll 4)	Camundongos	Níveis inferiores (em relação ao grupo controle) de peroxidação lipídica no cérebro de camundongos deficientes em TLR4 submetidos à modelo de AVC isquêmico, juntamente com menor resposta inflamatória e redução do tamanho do infarto.	(CASO <i>et al.</i> , 2007)

	15-A(2t)-cyclopentenona isoprostano	Cérebros humanos e culturas neuronais primárias	Isquemia causa geração de espécies reativas de oxigênio, influxo de cálcio, peroxidação lipídica e formação de 15-A(2t)-IsoP.	(ZEIGER <i>et al.</i> , 2009)
	MiR-17-92 (MicroRNA)	Células humanas HUVEC	O miR-17-92 protege as células endoteliais da ferroptose induzida por erastina, modulando o eixo A20 (lipoproteína de zinco A20)-ACSL4 (membro da família de cadeia longa 4 da Acil-CoA sintetase).	(XIAO <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: adaptado de (BU *et al.*, 2021)

A peroxidação lipídica, que representa um evento promotor da ferroptose, pode ser iniciada pelo radical hidroxila, levando à formação de radicais lipídicos e radicais peróxil lipídicos, que reagem com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) em uma reação de propagação para gerar peróxidos lipídicos (LIU *et al.*, 2022). Nesse contexto, a glutathione peroxidase 4 (GPX4), uma enzima contendo selenocisteína e que possui glutathione como co-substrato, tem papel central nas defesas antioxidantes, pois converte hidroperóxidos lipídicos potencialmente tóxicos em álcoois lipídicos não tóxicos (Figura 4) (YAN *et al.*, 2021). A capacidade reduzida da GPX4 em detoxificar lipoperóxidos, induzida pela depleção de GSH com erastina ou glutamato (inibidores do sistema Xc⁻, um antiportador de cistina/glutamato, que ao ser inibido impacta diretamente os níveis intracelulares de GSH e a atividade da GPX4), ou com RSL3 (inibidor de GPX4), resulta em intensa peroxidação lipídica e morte celular (STOCKWELL *et al.*, 2017).

Figura 4 – Eliminação de peróxidos lipídicos pela GPX4.

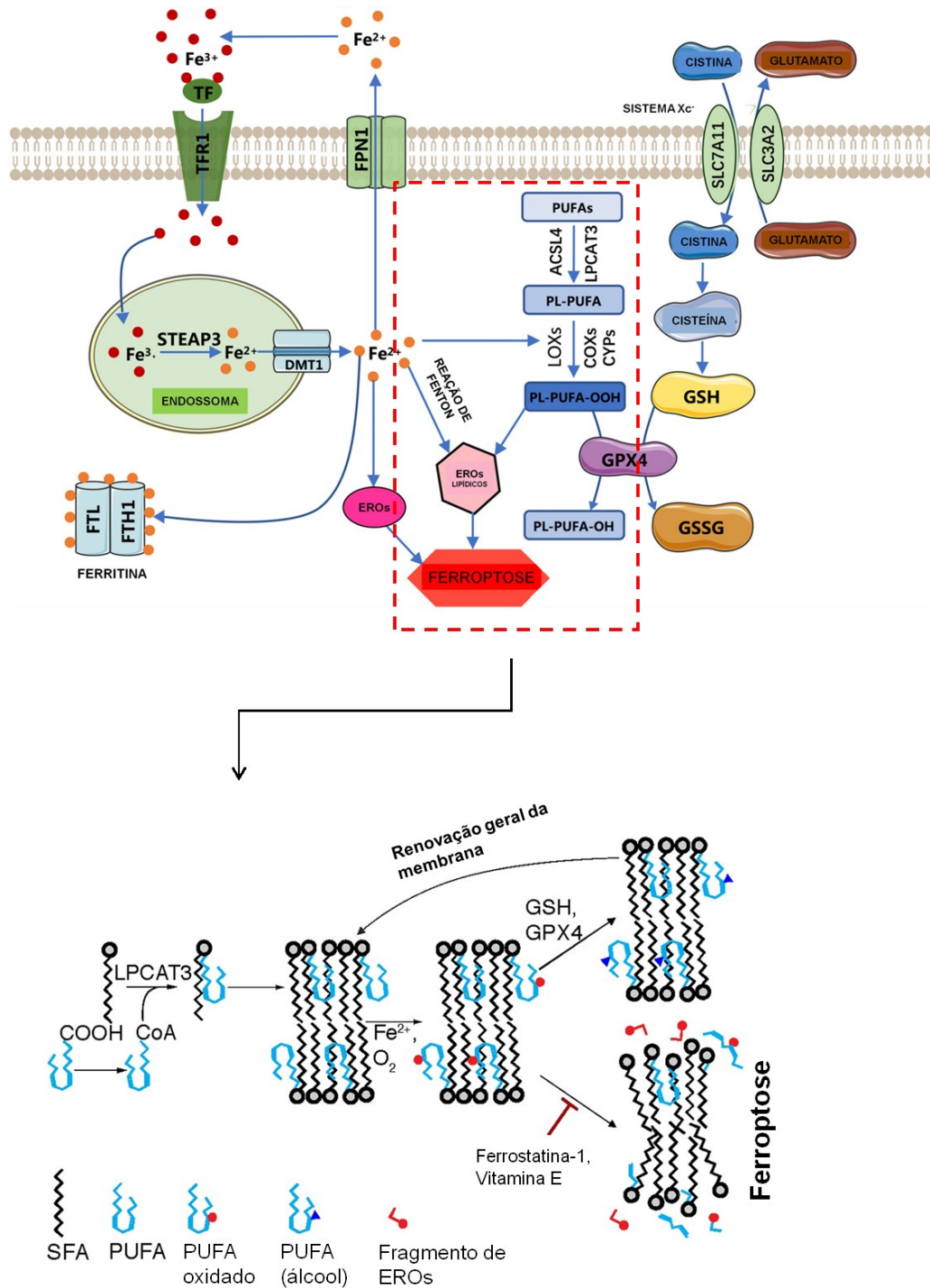


A GPX4 utiliza glutathione para eliminar peróxidos lipídicos formados em fosfolipídios contendo ácidos graxos poliinsaturados. A glutathione reduzida (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) é sintetizada a partir de glutamato, cisteína e glicina em duas etapas, pelas enzimas citosólicas dependentes de ATP glutamato-cisteína ligase (GCL) e glutathione sintetase (GSS). A GSH é essencial para a reação catalisada por GPX4, pois serve como um doador de elétrons para reduzir hidroperóxidos fosfolipídicos tóxicos a álcoois fosfolipídicos não tóxicos, gerando a glutathione oxidada (GSSG) como um subproduto. Por fim, a GSH pode ser regenerada reduzindo a GSSG usando a glutathione redutase (GR) (FORCINA; DIXON, 2019). Fonte: adaptado de (STOCKWELL *et al.*, 2017).

No contexto da ferroptose, o ferro pode participar em três vias que levam ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica. Na primeira, o Fe^{2+} intracelular livre leva à geração de EROs através da reação de Fenton, uma reação química inorgânica envolvendo peróxidos e Fe^{2+} para produzir radicais hidroxila solúveis ($\text{OH}\cdot$) ou alcoxi lipídico ($\text{RO}\cdot$) (DIXON; STOCKWELL, 2014). Em segundo lugar, as EROs podem ser geradas através da auto-oxidação lipídica, uma reação em cadeia de radicais livres autocatalítica que pode gerar hidroperóxidos lipídicos na presença de ferro (SHAH;

SHCHEPINOV; PRATT, 2018). Em terceiro lugar, o ferro tem papel importante como um componente na subunidade catalítica das lipoxigenases (LOXs), que oxidam ácidos graxos poliinsaturados resultando em peróxidos lipídicos (DIXON; STOCKWELL, 2014). A família das LOXs (enzimas modificadoras de lipídios e dependentes de ferro) é ativada por depleção de glutathione e inibida pela quelação de ferro (ABEYSINGHE *et al.*, 1996; DIXON; STOCKWELL, 2014; LI; MAHER; SCHUBERT, 1997). Para que ocorra a peroxidação lipídica, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) precisam ser esterificados com fosfolipídios de membrana pela catálise da acil-CoA sintetase membro da família 4 de cadeia longa (ACSL4) e a lisofosfatidilcolina aciltransferase 3 (LPCAT3) (DOLL; CONRAD, 2017). Então, as LOXs participam do processo de peroxidação lipídica ferro-dependente, podendo catalisar a conversão de PUFAs em hidroperóxidos lipídicos (Figura 5) (LIU *et al.*, 2022). Notavelmente, o aumento de 12/15-LOX foi reportado após AVC isquêmico experimental, contribuindo para danos neurológicos, enquanto a inibição de 12/15-LOX reverteu os efeitos negativos induzidos pelo modelo (PEKCEC *et al.*, 2013; YIGITKANLI *et al.*, 2013).

Figura 5 – Peroxidação lipídica na ferroptose.



A imagem inferior destaca o papel dos lipídios na ferroptose. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), representados em azul claro, são inseridos em fosfolipídios (PF) com ácidos graxos saturados (SFAs) em um processo que envolve a acil-CoA sintetase membro da família 4 de cadeia longa (ACSL4) e a lisofosfatidilcolina aciltransferase 3 (LPCAT3). A ferroptose envolve a oxidação (círculos vermelhos) de PUFAs, que podem ser reparados pela GPX4, que reduz os PUFAs oxidados a álcoois lipídicos (triângulos azuis). Na ausência de GPX4, os PUFAs oxidados podem liberar as espécies reativas de oxigênio (fragmento vermelho), levando a destruição da membrana. Fonte: adaptado de (AGMON *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2022).

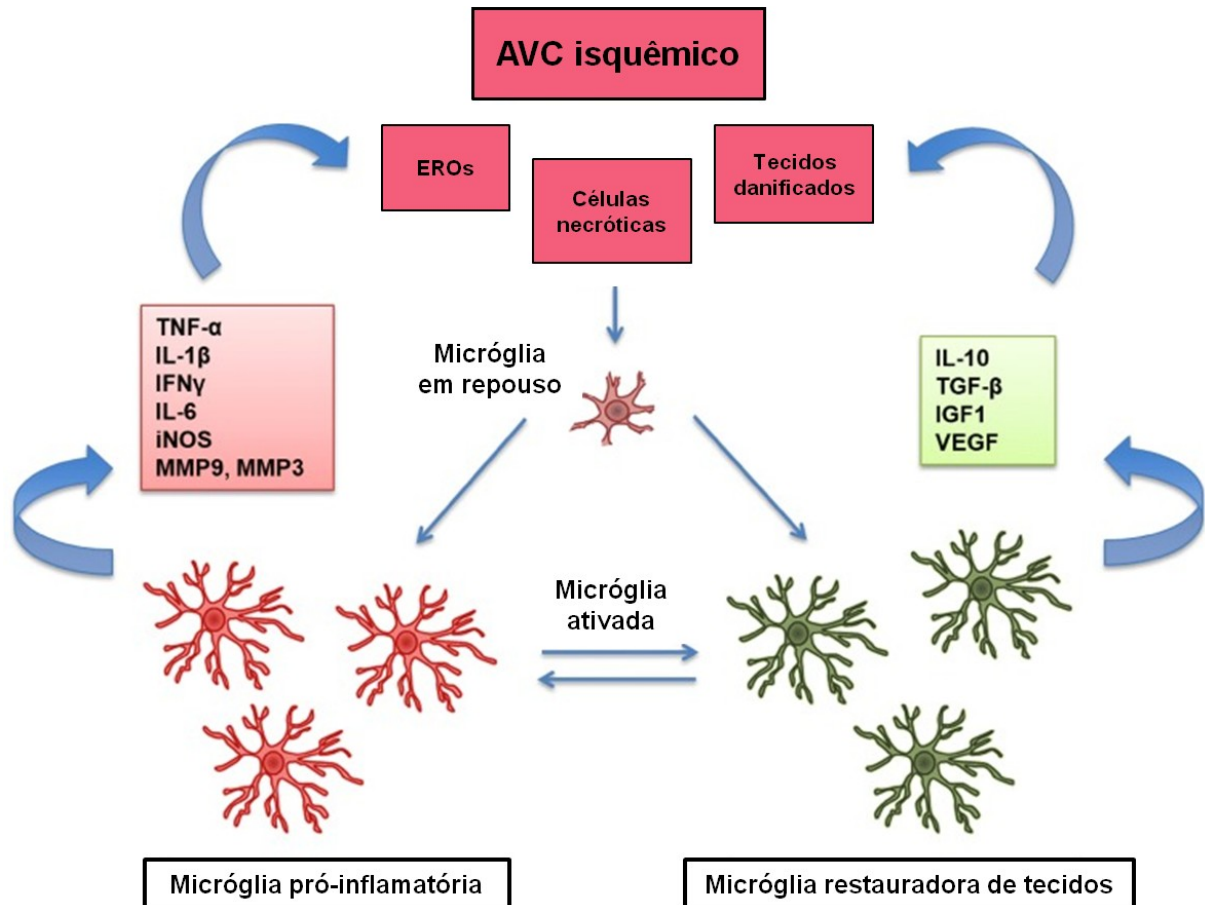
1.3 MICRÓGLIAS, ASTRÓCITOS E NEUROINFLAMAÇÃO PÓS-AVC ISQUÊMICO

A participação da ferroptose na morte neuronal induzida pelo AVC isquêmico é uma proposta relativamente atual, considerando que a ferroptose foi recentemente descrita e muitos dos seus mecanismos não são totalmente compreendidos. Contudo, o esclarecimento dessa via possui crescente suporte científico. Além da ferroptose, a neuroinflamação protagonizada por células da glia é um mecanismo de interesse no contexto do AVC isquêmico. Uma isquemia aguda cerebral desencadeia a ativação de uma série de eventos inflamatórios, mediados principalmente por micróglia e astrócitos (ZHANG; PHAN; SOBEY, 2021). A inflamação, que é iniciada dentro de minutos a horas, torna-se um dos principais mecanismos de injúria no AVC isquêmico, podendo durar por dias (LO; DALKARA; MOSKOWITZ, 2003). Células estressadas e necróticas, devido à isquemia cerebral, liberam moléculas descritas como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), desencadeando uma resposta inflamatória (DONG *et al.*, 2021). São exemplos de DAMPs a proteína de choque térmico, ATP, trifosfato de uridina (UTP) e proteína caixa 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) (BROUGHTON *et al.*, 2013; GELDERBLOM *et al.*, 2015). Tais moléculas podem ativar a micróglia através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como a família de receptores tipo Toll (TLR1 a 13) e supressão de tumorigenicidade 2 (ST2) (DONG *et al.*, 2021).

As micróglia são células imunes residentes no sistema nervoso central, descritas como facas de dois gumes (do inglês *double-edged sword*), pois possuem aspectos protetores ou deletérios, melhorando ou agravando a condição fisiológica ou patológica em que atuam (HICKMAN *et al.*, 2018). A desregulação das funções sentinela, limpeza e defesa da micróglia está associada a danos neuronais em doenças como esclerose lateral amiotrófica, Alzheimer, Parkinson, Huntington e acidente vascular cerebral (HICKMAN *et al.*, 2018; IIZUMI *et al.*, 2016). Classicamente, a micróglia é dividida em dois perfis opostos (Figura 6), um pró-inflamatório (M1) e outro anti-inflamatório (M2); contudo, alguns estudos indicam que tais estados opostos e polarizados não representam certas condições (pato)fisiológicas no cérebro (BACHILLER *et al.*, 2018; RANSOHOFF, 2016). Embora uma micróglia "ativada" seja capaz de liberar inúmeros fatores inflamatórios que podem danificar os neurônios, não podemos desconsiderar o possível papel protetor desses sinais, uma vez que existe uma complexa conversa cruzada entre a micróglia e neurônios, e o resultado dessas interações

pode ser benéfico em certas condições (CHEN; TRAPP, 2016; HELLWIG; HEINRICH; BIBER, 2013; SZEPESI *et al.*, 2018).

Figura 6 – Perfis clássicos de ativação microglial durante um AVC isquêmico.



A figura ilustra esquematicamente a transição da micróglia em repouso para seu estado ativado. No AVC isquêmico, a micróglia pode assumir dois estados opostos. O estado M1 produz mediadores pró-inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interferon- γ (IFN γ), interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e enzimas proteolíticas (MMP9, MMP3). O estado M2 é caracterizado pela produção de mediadores antiinflamatórios, como IL-10, fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Fonte: adaptado de (QIN *et al.*, 2019).

Nos modelos experimentais de AVC isquêmico, é possível achar evidências do papel benéfico da micróglia. Foi reportado que a micróglia ativada é essencial para a sobrevivência neuronal em um modelo animal de AVC isquêmico (THORED *et al.*, 2009). De fato, a ablação da micróglia resulta em um aumento significativo no tamanho do infarto, com elevada apoptose neuronal, após modelo de AVC isquêmico (oclusão transitória da artéria

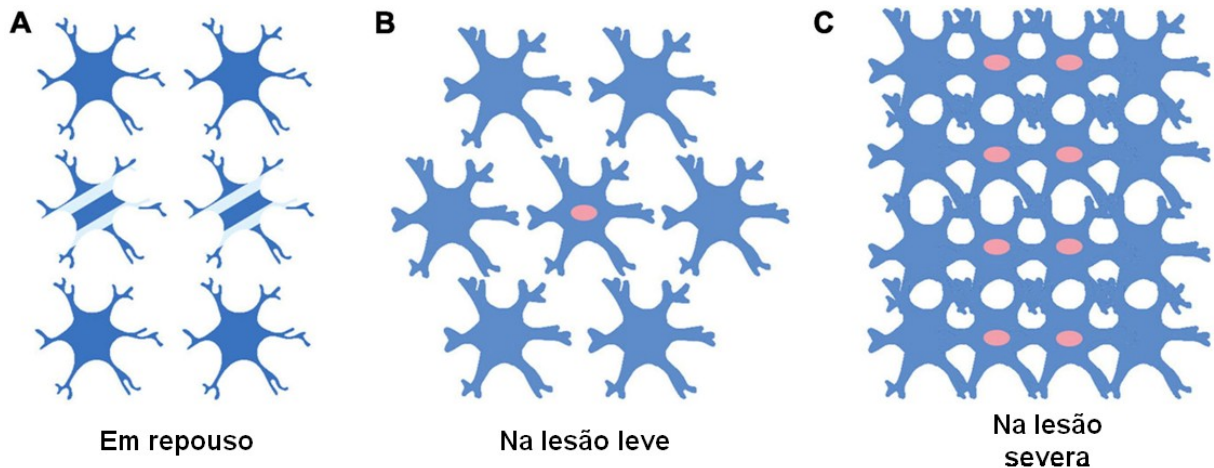
cerebral média) (LALANCETTE-HÉBERT *et al.*, 2007). Interessantemente, em modelo de isquemia cerebral focal induzida por endotelina-1 em ratos, foi observado que a micróglia desempenhou papel antiinflamatório, fagocitando granulócitos polimorfonucleares em 24 h após a lesão isquêmica, e reduzindo a morte neuronal (NEUMANN *et al.*, 2008). Notavelmente, um importante estudo demonstrou que a eliminação seletiva da micróglia levou a um aumento de 60% no tamanho do infarto, que é revertido pelo repovoamento microglial (SZALAY *et al.*, 2016). Adicionalmente, a micróglia desempenhou papel na redução da lesão excitotóxica, pois sua ausência resultou em respostas neuronais desreguladas de cálcio, sobrecarga de cálcio e aumento da morte neuronal (SZALAY *et al.*, 2016).

Em um AVC isquêmico, a micróglia responde a injúria antes dos astrócitos, podendo ativá-los posteriormente (QIN *et al.*, 2019). Então, os astrócitos ativam micróglia distantes da zona isquêmica, aumentando a secreção de citocinas inflamatórias (QIN *et al.*, 2019). Astrócitos, o tipo de célula glial mais abundante do sistema nervoso central mamífero, em condições fisiológicas, desempenham diversas funções como a regulação da homeostase e metabolismo dos íons, auxiliam na formação de sinapses e no suprimento de energia dos neurônios, desempenham papel na liberação de neurotransmissores por meio de exocitose e canais iônicos, além de regular o fluxo de sangue no cérebro (SHEN *et al.*, 2021).

Os astrócitos mudam drasticamente após um AVC isquêmico, sofrendo alterações morfológicas e funcionais (Figura 7) (ESCARTIN *et al.*, 2021). Astrócitos reativos podem liberar fatores tróficos e fatores sinaptogênicos, promovendo a sobrevivência neuronal (MORIZAWA *et al.*, 2017). Além disso, a polimerização de filamentos intermediários do tipo III, especialmente a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), também é observada em astrócitos reativos (LIVNE-BAR *et al.*, 2016). Tais adaptações têm papel protetor, favorecendo a remodelação dos circuitos neuronais (MORIZAWA *et al.*, 2017). No entanto, foi relatado que, após um AVC isquêmico, os astrócitos apresentam características fagocitárias (MORIZAWA *et al.*, 2017). De fato, os astrócitos possuem genes relacionados à via de engolfamento de sinapses, incluindo receptores fagocitários e opsoninas, mediando a eliminação de sinapses via MEGF10 e MERTK (CHUNG *et al.*, 2013). Notavelmente, a deleção desses receptores fagocitários reduziu o dano cerebral e melhorou os resultados neurocomportamentais em camundongos isquêmicos (SHI *et al.*, 2021). Embora a função fagocítica dos astrócitos seja geralmente considerada benéfica para a recuperação cerebral, estudos recentes indicam o contrário, relatando que os astrócitos danificam sinapses vivas na doença de Alzheimer e

neurônios viáveis no acidente vascular cerebral (NEHER *et al.*, 2013; SAVAGE *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2021).

Figura 7 – Diferenças morfológicas em astrócitos dependendo do grau da lesão no AVC isquêmico.



A figura ilustra esquematicamente a progressão da reatividade astrocitária. Astrócitos em estado de repouso (A); é possível observar limites claros e definidos entre as células, com pouca ou nenhuma proliferação (A). Quando a lesão ocorre, a maioria dos astrócitos expressa níveis detectáveis de GFAP, os corpos celulares e processos dos astrócitos tornaram-se hipertróficos, e a proliferação começa a aparecer, porém é possível observar limites claros entre as células (B). Em uma lesão severa, o corpo celular dos astrócitos é visivelmente hipertrófico, e um grande número de proliferação e difusão leva à sobreposição entre as células (C). Por fim, os astrócitos em proliferação formarão cicatrizes gliais entre áreas danificadas e tecidos saudáveis. As células com núcleos vermelhos representam astrócitos em proliferação. Fonte: adaptado de (SHEN *et al.*, 2021).

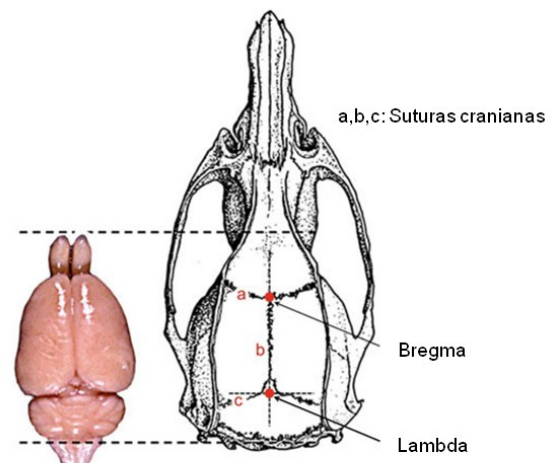
1.4 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* DE AVC ISQUÊMICO INDUZIDO POR ENDOTELINA-1 (ET-1)

Endotelina-1, um peptídeo de 21 resíduos de aminoácidos, é um potente vasoconstritor produzido principalmente por células endoteliais (FARACO *et al.*, 2013). A ET-1 atua em dois receptores distintos. Os receptores ET_A, principalmente expressos em células musculares lisas vasculares, quando ativados levam a uma vasoconstrição; enquanto que os receptores ET_B, principalmente expressos em células endoteliais, induzem vasodilatação promovendo a liberação de óxido nítrico (NO) (FARACO *et al.*, 2013). A significativa habilidade vasoconstritora da ET-1 a tornou uma valiosa ferramenta para a indução experimental de isquemia cerebral focal. O modelo foi originalmente desenvolvido

para induzir, através de aplicação tópica de ET-1, vasoconstrição na superfície abluminal da artéria cerebral média em ratos, posteriormente foi modificado para injeções estereotáxicas de ET-1 no tecido adjacente à artéria cerebral média (MACRAE *et al.*, 1993; SHARKEY; BUTCHER, 1995). Adicionalmente, é possível realizar a aplicação de ET-1 diretamente no cérebro, através de uma cirurgia estereotáxica, produzindo uma lesão isquêmica focal (WINDLE *et al.*, 2006). Entretanto, o modelo de AVC isquêmico mais utilizado em roedores é o da oclusão da artéria cerebral média por sutura intraluminal (MCAO) (SOMMER, 2017). Apesar de ser um dos modelos que mais se assemelha a um AVC isquêmico humano, o MCAO possui desvantagens significativas, como o nível alto de invasividade, resultando em lesões extensas e de difícil controle quanto à localização, que podem gerar dificuldades de alimentação e deterioração da saúde do animal (SCHIRRMACHER *et al.*, 2016; WINDLE *et al.*, 2006). A indução do AVC isquêmico com esse modelo geralmente não afeta o córtex motor dos roedores, além da possibilidade de oclusão acidental de outras artérias, impactando regiões do cérebro não tipicamente afetadas no AVC humano (DITTMAR *et al.*, 2003; MCCOLL *et al.*, 2004; WINDLE *et al.*, 2006).

Considerando essas desvantagens, o modelo adotado nesse trabalho representa uma alternativa válida para a indução experimental de AVC isquêmico através de injeções estereotáxicas de ET-1 (Figura 8). Isto porque a aplicação de ET-1 na superfície do córtex causa uma redução dose-dependente do fluxo sanguíneo local por pelo menos uma hora, resultando em uma lesão bem definida (FUXE *et al.*, 1997). Isto é, a versatilidade do modelo permite que o local e tamanho do infarto sejam modificáveis, por meio da alteração da dose de ET-1 administrada e da coordenada cerebral desejada. Adicionalmente, há indução de lesão por isquemia/reperfusão, pois quando o efeito da ET-1 diminui, o fluxo sanguíneo é restabelecido gradativamente, representando assim a situação de isquemia focal transitória (SOMMER, 2017). Por fim, o modelo de AVC isquêmico utilizado nesse trabalho é capaz de induzir uma lesão isquêmica consistente e similar a MCAO, mas garantindo déficits comportamentais com uma maior taxa de sucesso e baixa mortalidade (WINDLE *et al.*, 2006).

Figura 8 – Aparelho estereotáxico e pontos de referência.



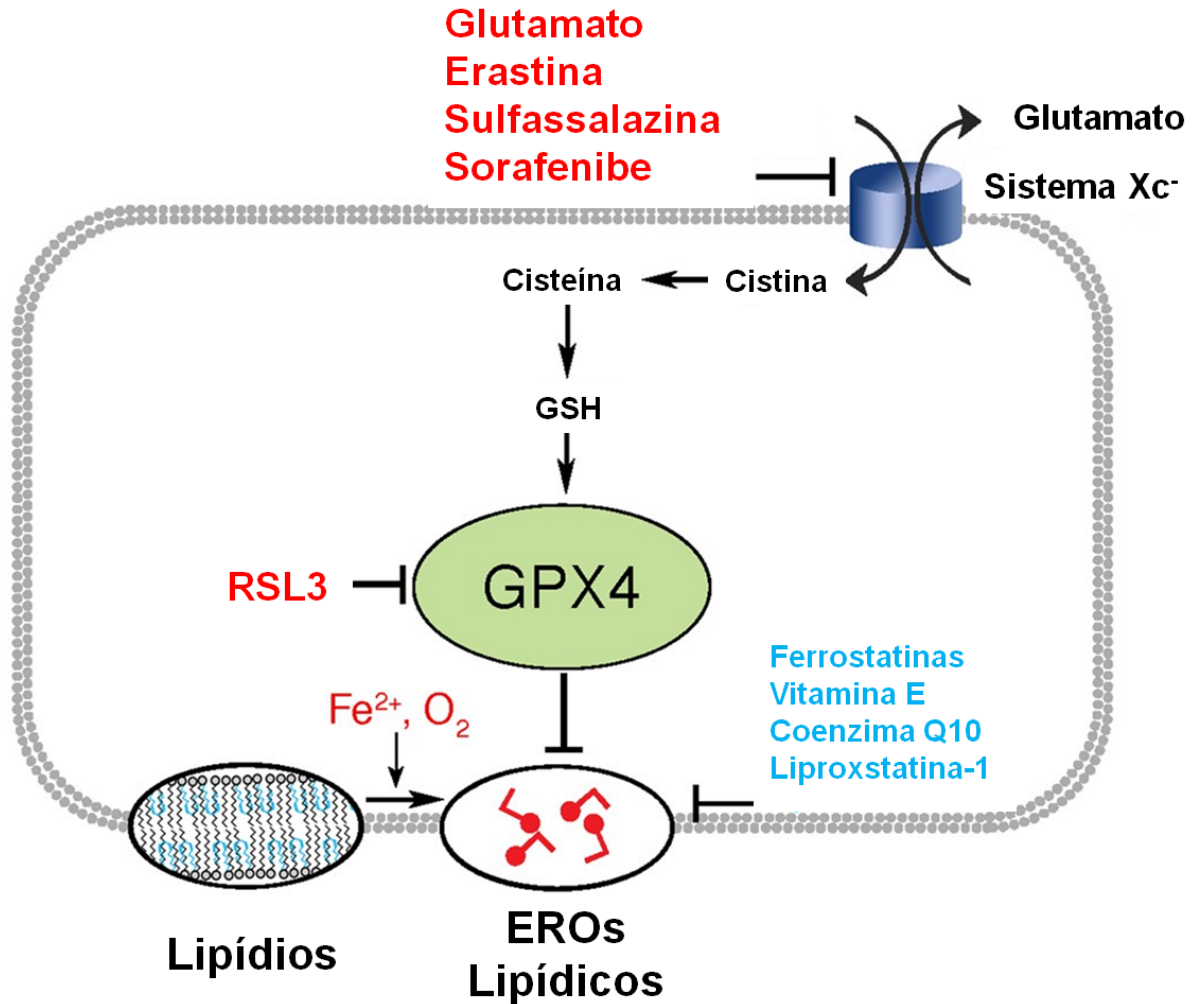
Na imagem superior vemos o animal posicionado no aparelho estereotáxico, o qual é mostrado em detalhes na imagem inferior esquerda. As suturas cranianas são mostradas em a, b e c (imagem inferior direita). As suturas cranianas são usadas para achar o bregma e o lambda, os quais são utilizados como referência para as coordenadas das injeções estereotáxicas. Fonte: adaptado de (FERRY; GERVASONI; VOGT, 2014; SCHMIDT *et al.*, 2012).

1.5 O MODELO DA FERROPTOSE EM CÉLULAS HT22

As células HT22, linhagem imortalizada de hipocampo de camundongo, tornaram-se uma importante ferramenta para o estudo *in vitro* dos mecanismos de neurotoxicidade induzidos por glutamato (FUKUI *et al.*, 2009). Particularmente, a ferroptose induzida por glutamato em células HT22 é um modelo bem estabelecido (BUENO *et al.*, 2020; NAIME *et al.*, 2021; TOBABEN *et al.*, 2011). Uma das razões que tornam o modelo relevante para o estudo da ferroptose é a carência da expressão de receptores ionotrópicos de glutamato, logo, a excitotoxicidade induzida por glutamato é insignificante, pois essas células não são suscetíveis ao influxo rápido de cálcio induzido pelo glutamato, ou outros efeitos mediados pelo receptor de glutamato (TOBABEN *et al.*, 2011).

Nas células HT22, altas concentrações de glutamato extracelular inibem a captação de cistina, inibindo o sistema Xc^- (Figura 9). O antiporte de cistina/glutamato é realizado pelo sistema Xc^- , o qual transporta cistina para dentro das células em troca de glutamato na proporção de 1:1 (LEWERENZ; MAHER; METHNER, 2012). De nota, a força motriz para a importação de cistina nas células pelo sistema Xc^- é o gradiente de concentração de glutamato, que deve estar alto no meio intracelular e baixo no meio extracelular, logo, o glutamato é o inibidor mais relevante deste sistema em condições fisiológicas (LEWERENZ; MAHER; METHNER, 2012). A inibição do sistema Xc^- leva a uma diminuição dos níveis intracelulares de cisteína (devido à falta de cistina), que conseqüentemente comprometem a síntese de glutathiona (GSH) (YAN *et al.*, 2021). A depleção de GSH impacta negativamente a atividade da enzima glutathiona peroxidase 4 (GPX4), uma importante enzima antioxidante, reparadora de lipídios e inibidora da ferroptose (AGMON *et al.*, 2018). Logo, a depleção de GSH e inibição da atividade da GPX4 levam ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica, resultando na morte celular por ferroptose (Figura 9) (HUANG *et al.*, 2020; YAN *et al.*, 2021).

Figura 9 – Vias regulatórias que levam a inibição da GPX4.



A inibição do sistema Xc⁻ induzida por glutamato reduz as concentrações intracelulares de cistina e cisteína, levando a depleção de GSH e, conseqüentemente, prejuízo à atividade da GPX4. Por fim, resulta no acúmulo de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. Indutores (vermelho) e inibidores (azul) da ferroptose.

Fonte: adaptado de (AGMON *et al.*, 2018).

1.6 CONSIDERAÇÕES

O principal tratamento para o AVC isquêmico é a terapia trombolítica com alteplase; contudo, a maioria dos pacientes não é elegível para seu uso e está sujeita a efeitos adversos, como hemorragias. Nesse cenário, o AVC isquêmico necessita de avanços terapêuticos. Considerando que um crescente número de evidências científicas indica a participação da

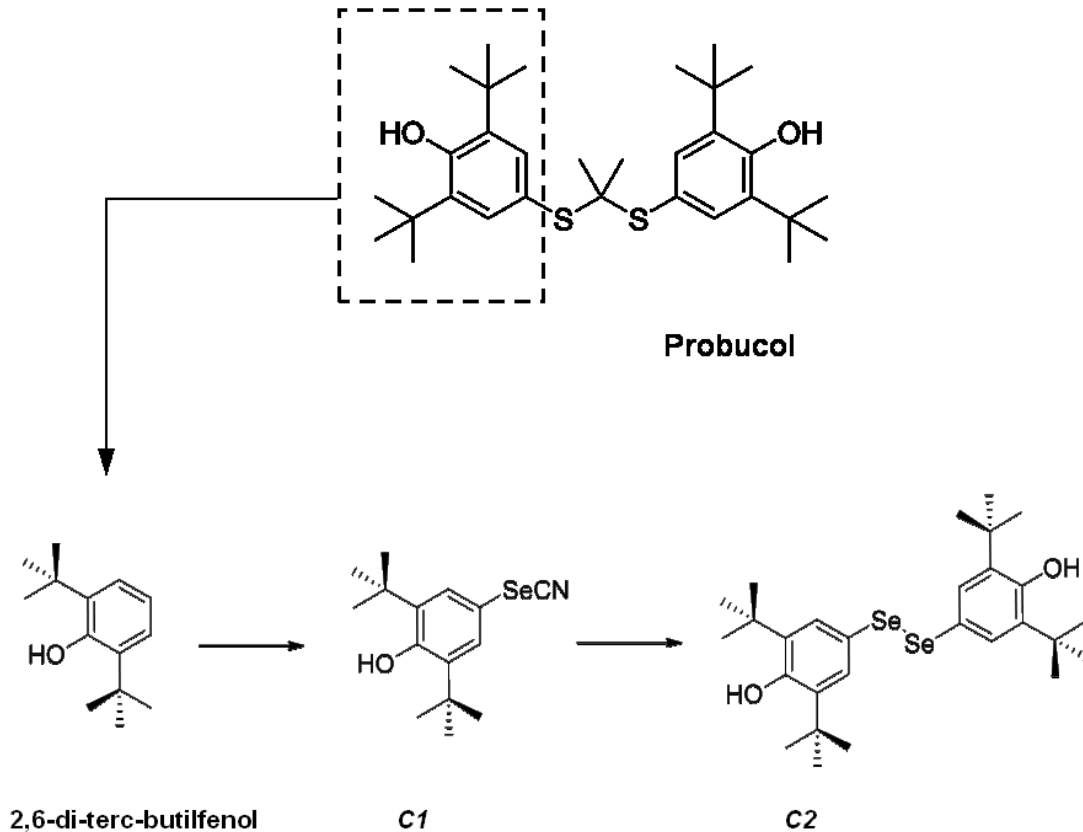
ferroptose em condições neuropatológicas, incluindo o AVC isquêmico, nosso trabalho investigou diferentes estratégias experimentais (*in vivo* e *in vitro*), com o objetivo de modular a ferroptose para reduzir os prejuízos à saúde dos pacientes.

Como exposto no item 1.4, um modelo experimental de AVC isquêmico induzido por ET-1 em ratos foi utilizado neste trabalho. Tendo em vista que a ET-1 gera uma lesão por isquemia/reperfusão, juntamente com déficits comportamentais, é plausível argumentar que esse modelo possa induzir, em parte, morte neuronal por ferroptose. Dentro desse modelo *in vivo*, nossa primeira estratégia para mitigar os danos (em parte ferroptose) induzidos pela isquemia cerebral foi a utilização de um análogo inédito do probucol. O probucol é um medicamento hipocolesterolêmico com longo histórico na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (YAMASHITA; MASUDA; MATSUZAWA, 2015). Além de sua ação hipocolesterolêmica, estudos recentes baseados em modelos oxidativos de neuropatologias indicam que o probucol também apresenta efeitos neuroprotetores (COLLE *et al.*, 2012; COLLE *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2012). Contudo, devido aos efeitos adversos significativos induzidos pelo probucol em humanos (JUNG *et al.*, 2016; TARDIF *et al.*, 2003), os esforços científicos têm se concentrado no design e síntese de análogos do probucol (por exemplo, succinobucol) que podem potencialmente compartilhar os efeitos positivos do composto original, mas com efeitos adversos reduzidos ou ausentes (COLLE *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; TARDIF *et al.*, 2003). Notavelmente, evidências recentes mostraram que alguns análogos de probucol são capazes de mitigar os eventos oxidativos subjacentes à ferroptose em condições *in vitro* (BUENO *et al.*, 2020; NAIME *et al.*, 2021), embora dados em circunstâncias *in vivo* estejam ausentes. Adicionalmente, a utilização de um análogo do probucol (**C2** – Figura 10) em um modelo animal de AVC isquêmico foi justificada pelo papel citoprotetor do **C2** contra a ferroptose induzida por glutamato em células HT22 (resultados apresentados no Apêndice B, os quais representam um manuscrito elaborado a partir dos resultados *in vivo* desta tese somados aos dados *in vitro* derivados de uma dissertação de mestrado vinculada ao nosso grupo de pesquisa (SOUZA, 2017).

Por fim, nossa segunda abordagem experimental investigou se produtos oriundos da ativação microglial (culturas BV-2 estimuladas com LPS) seriam capazes de reduzir, inibir ou agravar a morte neuronal ferroptótica induzida por glutamato em células HT22. Dessa forma, contrastando o primeiro estudo, exploramos em um modelo *in vitro* a possível comunicação benéfica entre micróglia e neurônios. Tal investigação oferece uma estratégia inédita para a

modulação da morte neuronal por ferroptose, podendo elucidar novos caminhos terapêuticos para o combate de condições neuropatológicas, como o AVC isquêmico.

Figura 10 – Novos análogos do probucol.



A figura mostra um breve esquema da via sintética. *C1* foi sintetizado a partir de 2,6-di-*tert*-butilfenol e *C2* foi sintetizado a partir de *C1*, o qual não foi utilizado no estudo *in vivo* por apresentar toxicidade aos animais (Apêndice B).

2 JUSTIFICATIVA

Essa tese foi dividida em dois estudos experimentais (um *in vivo* e outro *in vitro*) que focaram em estratégias para diminuir o dano causado por eventos que ocorrem em condições neuropatológicas, em especial o AVC isquêmico, mitigando a morte celular causada por ferroptose. Considerando o papel emergente da ferroptose no AVC isquêmico, nesse trabalho

investigamos em (i) modelo animal de AVC isquêmico o papel neuroprotetor de um análogo inédito do probucol, e (ii) avaliamos o potencial citoprotetor do meio condicionado derivado de culturas microgliais em modelo *in vitro* de dano ferroptótico induzido por glutamato. A utilização de animais e a padronização de um modelo *in vivo* de AVC isquêmico induzido por ET-1, que fazem parte desta tese, foram justificadas por evidências que reportaram o papel benéfico dos análogos do probucol (**C1** e **C2**) em estudo *in vitro* com culturas neuronais HT22 (Apêndice B). Espera-se que a avaliação de moléculas inéditas e a investigação de relações benéficas entre neurônio e microglia possam gerar novas estratégias terapêuticas contra condições patológicas relacionada à ferroptose.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- i. Avaliar o potencial neuroprotetor de um análogo inédito do probucol contra AVC isquêmico induzido por ET-1 em modelo *in vivo* com ratos;
- ii. Avaliar o potencial citoprotetor do meio condicionado, derivado de culturas microgliais BV-2 estimuladas com LPS, contra dano ferroptótico induzido por glutamato em modelo *in vitro* com células neuronais HT22.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Padronizar um modelo experimental *in vivo* de AVC isquêmico induzido por ET-1 utilizando ratos Wistar;
- ii. Investigar, através de ensaios comportamentais, se o análogo do probucol (**C2**) possui efeito neuroprotetor em modelo *in vivo* de AVC isquêmico;
- iii. Investigar, através de ensaios imunohistoquímicos (astrócitos GFAP positivos), se o análogo do probucol (**C2**) possui a capacidade de reverter a significativa gliose reativa induzida por modelo *in vivo* de AVC isquêmico;
- iv. Padronizar um modelo de ativação microglial utilizando culturas BV-2 estimuladas com LPS;

v. Obter o meio condicionado derivado de células BV-2 estimuladas por LPS e investigar se ele causa prejuízos na viabilidade celular de cultivos neuronais HT22;

vi. Investigar se o meio condicionado possui efeito protetor contra dano ferroptótico induzido por glutamato em modelo *in vitro* com células neuronais HT22.

vii. Investigar, para fins comparativos, se o meio condicionado possui efeito protetor contra dano oxidativo induzido por *t*-BuOOH em modelo *in vitro* com células neuronais HT22.

4 METODOLOGIA

4.1 METODOLOGIA DO ESTUDO *IN VIVO*

Metodologia referente à investigação dos efeitos neuroprotetores do composto inédito **C2** em modelo animal de isquemia cerebral induzida por ET-1.

4.1.1 Químicos/reagentes

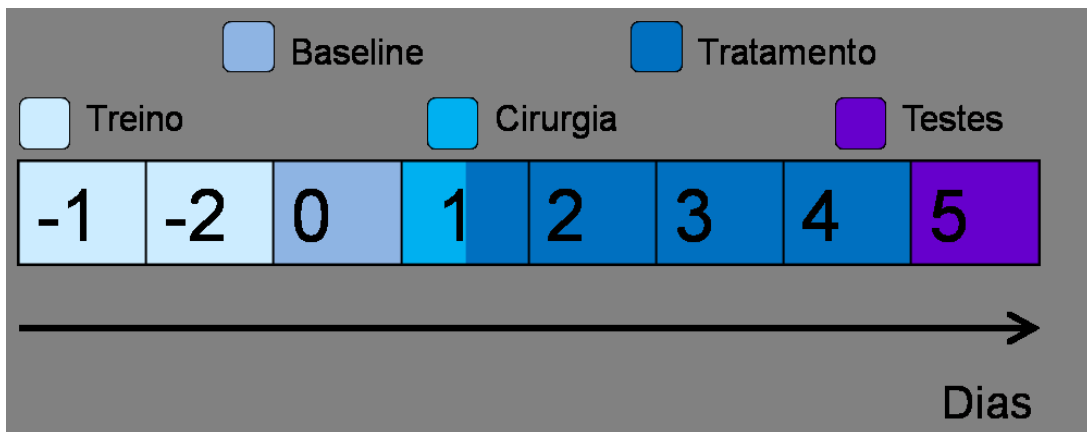
As informações referentes aos químicos/reagentes utilizados neste trabalho foram listadas em Apêndice A – Tabela suplementar 1, que apresenta os fornecedores e os códigos dos produtos.

4.1.2 Animais

Ratos Wistar machos e adultos (90 dias de idade, $n = 87$), com peso médio de 370 g, foram obtidos do biotério da UFSC. Os animais foram mantidos aos pares em gaiolas de polipropileno padrão (40 x 32 x 17 cm) com água e comida *ad libitum* (Nuvilab CR-1-Quimtia) dentro de um ciclo claro/escuro de 12 h (6h/18h). Antes dos procedimentos experimentais, os animais passaram por um período de 10 dias de adaptação aos pesquisadores e ao laboratório. Posteriormente, os animais foram numerados no dia menos dois (-2; Figura 11) e distribuídos aleatoriamente em um dos quatro grupos experimentais antes da cirurgia, com um gerador de números online (www.random.org). Após a indução da isquemia cerebral, observou-se a presença, ausência ou redução de parâmetros físicos e

comportamentais, como perda de peso, piloereção, higiene e alimentação (PERCIE DU SERT *et al.*, 2017). Alterações faciais relacionadas à dor (escala Grimace) também foram monitoradas (SOTOCINAL *et al.*, 2011). Sinais e sintomas graves como perda de peso maior que 20%, falta de mobilidade e resposta aos estímulos, e convulsões foram monitorados (PERCIE DU SERT *et al.*, 2017). Entretanto, nenhum animal apresentou sintomas considerados graves, não sendo necessária a eutanásia.

Figura 11 – Desenho experimental



A figura mostra o protocolo experimental adotado no estudo e sua progressão em dias. Treinamento: os animais foram treinados no teste do equilíbrio em feixe. Linha basal: o desempenho dos animais em todos os testes comportamentais foi avaliado antes das cirurgias. Cirurgia: injeção estereotáxica cerebral de endotelina-1. Tratamento: administração intraperitoneal de óleo de canola (veículo) ou C2. Testes: avaliações comportamentais.

Os animais foram monitorados de acordo com as diretrizes do IMPROVE (PERCIE DU SERT *et al.*, 2017) e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brasil) - protocolo número 3862280317. Os estudos em animais foram relatados em conformidade com as diretrizes ARRIVE (KILKENNY *et al.*, 2010).

4.1.3 Cálculo do tamanho amostral e número experimental

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base em um primeiro conjunto experimental de animais, cujos resultados foram posteriormente adicionados ao estudo

principal (composto por 4 conjuntos experimentais); detalhes nas Tabelas Suplementares 2 e 3; Figuras complementares 5, 6 e 7 (Apêndice A).

4.1.4 Avaliação preliminar toxicológica

Antes dos experimentos *in vivo* de isquemia focal (item 4.1.5), foi realizado um estudo toxicológico preliminar para investigar a possível toxicidade *in vivo* do análogo do probucol **C2**. Resumidamente, 10 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, sendo: (i) veículo (óleo de canola, n = 4); (ii) 10 mg/kg **C2** (n = 2); (iii) 25 mg/kg **C2** (n = 2); (iv) 100 mg/kg **C2** (n = 2). Animais receberam injeções intraperitoneais (1 mL/kg) do composto uma vez por dia durante quatro dias. A toxicidade avaliada baseou-se na taxa de mortalidade e na perda de peso corporal (Apêndice A - Figura Suplementar 1).

4.1.5 Protocolo da isquemia focal (procedimentos cirúrgicos)

Os animais foram inicialmente numerados no dia menos dois (-2; Figura 11) e distribuídos aleatoriamente em um dos quatro grupos experimentais antes da cirurgia, com um gerador de números online (www.random.org). No dia 1 (dia da cirurgia), os animais foram anestesiados com injeções intraperitoneais de cetamina (75 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg). Os pelos da cabeça dos animais foram aparados com tesoura e a área foi limpa com solução alcoólica de iodo. Cada animal foi posicionado no aparelho estereotáxico (Kopf Instruments) e uma incisão vertical foi feita para expor as linhas de sutura do crânio. Utilizando o bregma como referência, foram feitas três perfurações no crânio, com uma broca odontológica, nas seguintes coordenadas (WINDLE *et al.*, 2006):

A: Córtex motor direito, anteroposterior (AP) = 0,0 mm, mediolateral (ML) = -2,5 mm, dorsoventral (DV) = -2,3 mm;

B: córtex motor direito, AP = +2,3 mm, ML = -2,5 mm, DV = -2,3 mm;

C: Estriado dorsolateral direito, AP = +0,7 mm, MP = -3,8 mm, DV = -7,0 mm.

Para cada sítio, foram injetados 2 µL de ET-1 (800 pmol) ou veículo (solução salina estéril, NaCl 0,9 %), representando um total de 6 µL por animal. A ET-1 foi injetada a uma taxa de 0,5 µL/min, com intervalo de 1 min por microlitro (WINDLE *et al.*, 2006). Ao final da injeção local (2 µL), a agulha foi removida após 3 min de espera. A incisão foi suturada e o animal recebeu suporte pós-operatório com flunixinina meglumina (2,5 mg/kg) e soro

fisiológico (NaCl 0,9%) aquecidos à temperatura corporal, administrados por via subcutânea, de acordo com as diretrizes IMPROVE (PERCIE DU SERT *et al.*, 2017). Uma injeção intramuscular de um pentabiótico veterinário (24.000 UI/kg, suspensão com estreptomicinas e penicilinas) foi administrada para prevenir infecções. Por fim, os animais se recuperaram aos pares em suas gaiolas, com água e comida de fácil acesso. As regiões cerebrais e a concentração de ET-1 (800 pmol) foram escolhidas de acordo com um estudo anterior, que relatou para esse protocolo taxa de sobrevivência de 77%, e 100% de sobreviventes com déficits comportamentais (WINDLE *et al.*, 2006). Informações suplementares relacionadas ao modelo experimental e sua padronização são descritas na Figura Suplementar 2 (Apêndice A).

4.1.6 Tratamento pós-isquêmico

Com base nos resultados da avaliação toxicológica preliminar (Apêndice A - Figura Suplementar 1), **C2** não induziu efeitos tóxicos aparentes, como perda de peso, alterações comportamentais ou morte, portanto, foi estudado no modelo de isquemia focal. **C2** foi diluído em óleo de canola (usado como veículo no grupo controle) e foram utilizadas concentrações de 20 mg/kg e 50 mg/kg (baseada na avaliação toxicológica preliminar). O tratamento consistiu em uma única injeção intraperitoneal, uma vez ao dia durante quatro dias (dias 1, 2, 3, 4 - Figura 11), iniciando aproximadamente 1 h após os procedimentos cirúrgicos (administração de ET-1).

4.1.7 Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais foram realizados nos dias 0 e 5 (Figura 11). As sessões de treinamento para o teste do equilíbrio em feixe foram realizadas nos dias -2 e -1 (HAUSSER *et al.*, 2018; SCHAAR; BRENNEMAN; SAVITZ, 2010), quando os animais também foram aclimatados ao cilindro de acrílico utilizado nos testes do cilindro e remoção de adesivo (descrito abaixo).

4.1.7.1 Teste do cilindro

Considerando que a ET-1 foi injetada apenas no hemisfério direito, utilizamos o teste do cilindro para avaliar a assimetria locomotora dos membros anteriores. Os animais foram

colocados em um cilindro de acrílico (diâmetro de 20 cm; altura de 50 cm) e o uso espontâneo dos membros anteriores foi avaliado por 3 min (PLOUGHMAN *et al.*, 2009). Resumidamente, durante a exploração vertical, o número de contatos ipsilaterais (A) e contralaterais (B) com a parede do cilindro foi registrado (para detalhes, veja Apêndice A - Figura Suplementar 3). Para expressar a assimetria no uso do membro anterior contralateral, foi aplicada a seguinte fórmula (PLOUGHMAN *et al.*, 2009):

$$[B / (A+B)] \times 100$$

4.1.7.2 Teste do equilíbrio em feixe

O equilíbrio dos animais foi investigado por meio do teste do equilíbrio em feixe (HAUSSER *et al.*, 2018). Resumidamente, os ratos foram colocados individualmente em um feixe de madeira (comprimento, 60 cm; largura, 1,75 cm) e sua atividade exploratória foi avaliada durante 3 sessões de 1 min cada, com intervalos de 1 min, após, foi calculada a média desses valores (HAUSSER *et al.*, 2018). O feixe de madeira foi posicionado a uma altura de 80 cm do chão e possuía uma barreira (altura, 40 cm) para impedir o avanço do animal, obrigando os ratos a manterem o equilíbrio na área selecionada do feixe. As análises comportamentais foram realizadas usando um sistema de pontuação de acordo com o desempenho do animal no teste (HAUSSER *et al.*, 2018) (para detalhes, consulte o Apêndice A - Figura Suplementar 4). É importante mencionar que, antes dos testes, foram realizadas sessões de treinamento nos dias -1 e -2 (Figura 11) e os ratos foram considerados treinados após atingirem três escores de 1 ou 2 (HAUSSER *et al.*, 2018). Nenhum animal foi ferido neste teste; havia um suporte acolchoado sob o feixe de madeira, evitando qualquer acidente com os animais.

4.1.7.3 Teste da remoção do adesivo

O comprometimento das funções sensório-motoras foi investigado por meio do teste da remoção do adesivo (BALKAYA *et al.*, 2013; REWELL *et al.*, 2017). Resumidamente, com uma rápida restrição física do animal, uma fita adesiva quadrada (6 x 6 mm) foi fixada na palma de cada membro anterior. A fita adesiva foi fixada em ordem aleatória e antes do início do teste ambos os membros foram tocados, evitando viés (REWELL *et al.*, 2017). O teste foi

realizado no cilindro especificado do item 4.1.7.1 e o tempo de remoção de cada adesivo foi registrado por no máximo 5 min.

4.1.8 Processamento amostral

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados (semelhante ao item 4.1.5) e perfundidos transcardiacamente com tampão fosfato (0,1 M) e formaldeído (4%). Os cérebros foram removidos e pós-fixados em formaldeído (4%) por 24 h. Em seguida, os cérebros foram submetidos a soluções de sacarose (10%, 20% e 30%) para crioproteção e armazenados a -80°C. Posteriormente, as áreas cerebrais de interesse foram seccionadas (20 µm de espessura) em criostato e armazenadas na geladeira, submersas em tampão fosfato (0,1 M) com azida de sódio (0,5%).

4.1.9 Análises imunohistoquímicas

De acordo com o item 4.1.8, cortes coronais de 20 µm foram obtidos do estriado em criostato. As seções (*free-floating*) foram permeabilizadas com o tampão de lavagem (0,15% Triton X-100 em 0,1 M PBS), e depois incubadas por 30 min com 0,3% H₂O₂ para inibir peroxidases endógenas. Os sítios de ligação não específicos foram bloqueados com 5% de soro normal de cabra. Após 3 ciclos de lavagem, as seções foram incubadas com o anticorpo anti-proteína fibrilar ácida glial (GFAP, 1:500), diluída em tampão de lavagem com timerosal 0,02% por aproximadamente 18 h a 4 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:500), com posterior exposição à 3,3-diaminobenzidina (DAB), resultando em um precipitado de coloração marrom. Todas as imagens foram adquiridas usando o scanner de lâminas Axio Scan.Z1 (Zeiss, Alemanha). Em seguida, imagens de alta resolução da região de interesse (estriado) foram geradas no ZEN 3.4 (edição blue) e analisadas no ImageJ (National Institutes of Health, EUA). A análise consistiu em quantificar a porcentagem de área coberta por astrócitos GFAP positivos (quatro cortes por animal), por meio da densidade integrada, ou seja, a soma dos pixels de astrócitos GFAP positivos dentro do mesmo limiar foi quantificada.

4.1.10 Análise estatística

Inicialmente, o teste de Grubbs, também chamado de método ESD (extreme studentized deviate), foi realizado para detectar e excluir valores discrepantes significativos (outliers). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Os dados *in vivo* foram analisados usando ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os gráficos e ANOVAs foram realizados usando o software Graph-Pad PRISM® versão 7.0a (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no software Statistica, versão 8.0 (StatSoft , Inc., Tulsa, OK, EUA, 2008). Os resultados foram expressos como média \pm DP e significância foi considerada quando $P < 0,05$.

4.2 METODOLOGIA DO ESTUDO *IN VITRO*

Metodologia referente à avaliação do potencial citoprotetor do meio condicionado derivado de células BV-2 estimuladas com LPS contra dano ferroptótico induzido por glutamato, e dano oxidativo induzido por *t*-BuOOH.

4.2.1 Químicos/reagentes

As informações referentes aos produtos químicos/reagentes utilizados neste trabalho estão presentes na Tabela Suplementar 1 (Apêndice A), que apresenta os fornecedores e os códigos dos produtos.

4.2.2 Culturas celulares

A linhagem celular neuronal HT22 foi gentilmente cedida pelo Dr. David Schubert (Salk Institute, La Jolla, CA, EUA) e a linha celular microglial BV-2 foi gentilmente cedida pelo Professor Licio Augusto Velloso (Universidade Estadual de Campinas, Brasil). As culturas celulares HT22 (neurônios hipocâmpais de camundongo) e BV-2 (microglia derivada de camundongo) foram cultivadas em meio DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS), penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100 μ g/mL) e glutamina (2 mM) a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas até estarem 80-90%

confluentes e foram usadas entre a 3^a e 12^a passagem. Todos os experimentos foram realizados em placas de 96 poços.

4.2.3 Produção do meio condicionado e ensaio do óxido nítrico

As células BV-2 foram estimuladas com diferentes concentrações de LPS, variando de 5 a 100 ng/mL, em placas de 96 poços por 24 h. A fim de confirmar que tais concentrações de LPS foram suficientes para induzir a ativação microglial em células BV-2 e, assim, produzir um meio condicionado (MC), a produção de óxido nítrico (NO) foi estimada pela quantificação de nitrito usando o método de Griess (CHO *et al.*, 2016). Resumidamente, após 24 h de estimulação com LPS, o sobrenadante do meio de cultura de células BV-2 foi coletado e misturado com reagente de Griess (0,1% de dicloridrato de N-1-naftilenodiamina e 1% de sulfanilamida em 1% de ácido fosfórico), após 10 min de incubação à temperatura ambiente o resultado foi analisado a 543 nm (Tecan Infinite M200).

4.2.4 Protocolos de exposição à glutamato e *t*-BuOOH em células HT22

A fim de investigar se o MC produzido por células BV-2 estimuladas por LPS (item 4.2.3) seria capaz de induzir um efeito benéfico em cenários oxidativos, células HT22 foram expostas a glutamato e *t*-BuOOH, que foram reportados como causadores de estresse oxidativo, especialmente glutamato usado em modelos de ferroptose (BUENO *et al.*, 2020; KUČERA *et al.*, 2014). É importante notar que o glutamato é um indutor bem estabelecido de ferroptose (DIXON *et al.*, 2012; STOCKWELL *et al.*, 2017), enquanto o *t*-BuOOH pode induzir diferentes tipos de morte celular, como necrose, apoptose e necroptose (HWANG *et al.*, 2002; KIM; LEE; PARK, 2014; LOMBARDI *et al.*, 2002; MUTHAIAH *et al.*, 2017; PIAS; AW, 2002; ZHAO *et al.*, 2017). As células HT22 foram expostas a diferentes concentrações de glutamato (1 - 20 mM) ou *t*-BuOOH (5 - 100 µM) em placas de 96 poços por 24 h. Após esse período, a indução de toxicidade foi verificada pela viabilidade metabólica e morte celular (itens 4.2.6 e 4.2.7).

4.2.5 Protocolo de exposição ao MC em células HT22

As células HT22 foram expostas ao MC obtido conforme item 4.2.3. Vale ressaltar que todo MC produzido só foi utilizado em células HT22 após confirmação da ativação microglial (produção de nitrito) na maioria dos grupos. Resumidamente, as células HT22 foram semeadas em placas de 96 poços por 24 h, então metade (50 μ L) de seu meio de cultura foi removida e substituída por 50 μ L de MC por 6 h. Após este período, as células HT22 foram expostas durante 18 h a 15 mM de glutamato ou 30 μ M de *t*-BuOOH.

4.2.6 Ensaio da viabilidade metabólica celular

A viabilidade celular metabólica das células HT22 e BV-2 foi avaliada através de sua capacidade de reduzir o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), que foi quantificado conforme descrito anteriormente (MOSMANN, 1983). Depois que as células foram expostas a LPS, MC, glutamato ou *t*-BuOOH em placas de 96 poços, seu meio de cultura foi removido e uma solução de MTT foi adicionada, seguida de 1 h de incubação a 37°C. Em seguida, os poços foram esvaziados e o produto formazan foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO), e os resultados foram quantificados a 540 nm (Tecan Infinite M200).

4.2.7 Ensaio da morte celular

O ensaio de morte celular foi realizado com base na incorporação e ligação do iodeto de propídio (PI) ao DNA, produzindo fluorescência vermelha em células com membranas plasmáticas danificadas (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). Após as células serem expostas a LPS, CM, glutamato ou *t*-BuOOH em placas de 96 poços, 147 μ g/mL iodeto de propídio (PI) foi adicionado às células e, em seguida, incubado por 20 min a 37°C no escuro. A fluorescência foi quantificada a 535 nm de excitação e 617 nm de emissão (Tecan Infinite M200).

4.2.8 Análise estatística

Inicialmente, o teste de Grubbs, também chamado de método ESD (extreme studentized deviate), foi realizado para detectar e excluir valores discrepantes significativos (outliers). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Os

dados foram analisados usando ANOVA de uma ou duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey.

5 RESULTADOS

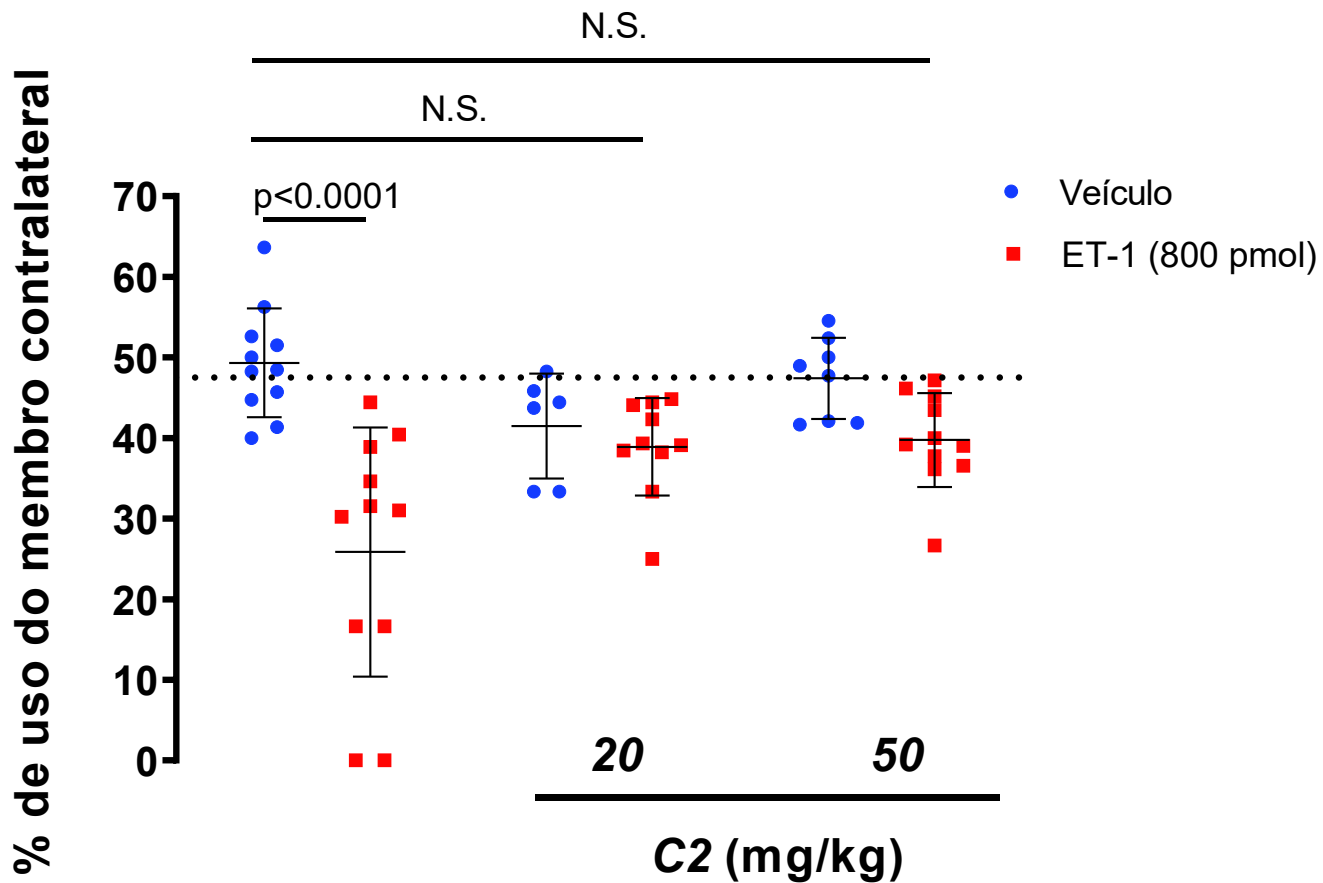
5.1 RESULTADOS DO ESTUDO *IN VIVO*

Resultados referentes à investigação dos efeitos neuroprotetores do composto inédito **C2** em modelo animal de isquemia cerebral induzida por ET-1.

5.1.1 **C2** recuperou a assimetria de uso do membro anterior induzida por ET-1

Considerando que a ET-1 foi injetada apenas no hemisfério direito, utilizamos o teste do cilindro para calcular o escore de assimetria de uso dos membros anteriores (KARTHIKEYAN *et al.*, 2019; PLOUGHMAN *et al.*, 2009). A porcentagem média de uso do membro anterior contralateral nos animais controle foi de 49,32%, semelhante à medida dos animais antes da administração de ET-1 (valor basal antes da cirurgia = 48,9%) (Figura 12). ET-1 causou uma significativa assimetria no uso dos membros anteriores durante a exploração vertical; houve redução significativa ($\cong 50\%$) no uso espontâneo do membro anterior contralateral ao fazer contatos com as paredes do cilindro (Figura 12). Em comparação aos controles, não foram observadas alterações significativas no percentual de uso do membro anterior contralateral nos animais submetidos ao protocolo de isquemia focal (administração de ET-1) e tratados com **C2**, independentemente da dose (Figura 12). A Figura suplementar 3 (Apêndice A) mostra imagens representativas dos animais no teste do cilindro, bem como perfis de uso do membro contralateral. Os principais perfis comportamentais também foram resumidos em vídeos, em que se destacam os contatos contralaterais normais e os contatos ipsilaterais excessivos (Apêndice A – [Vídeo Suplementar 1](#)).

Figura 12 – Desempenho dos animais no teste do cilindro.



Valor basal antes da cirurgia = 48.9 %

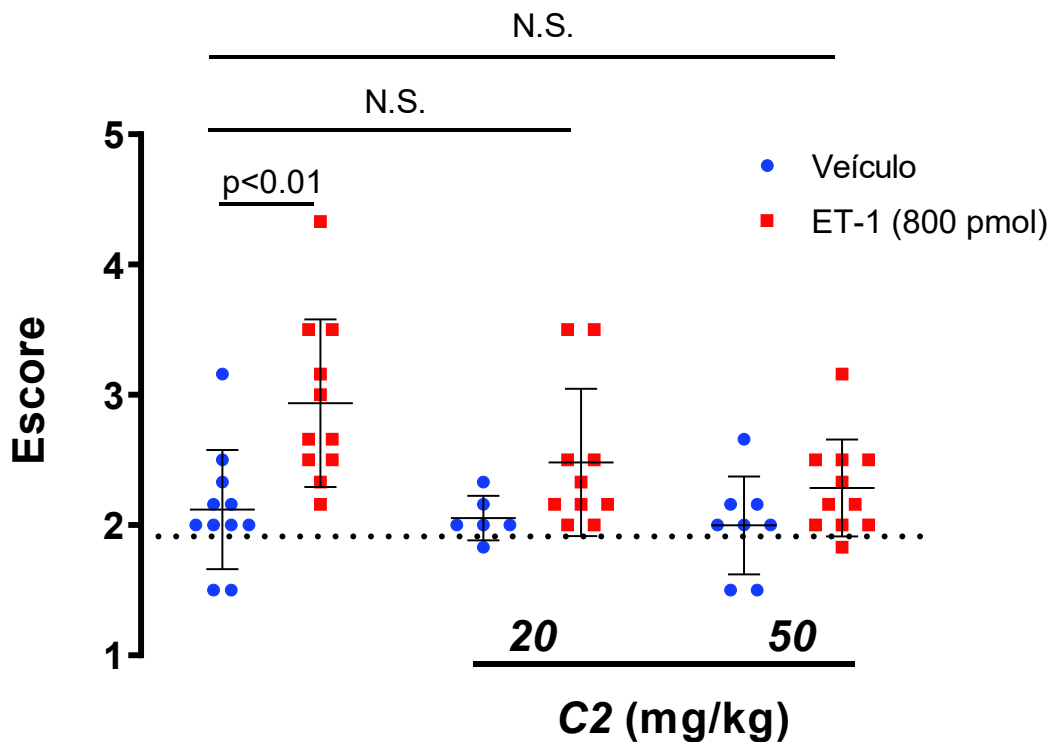
Comprometimentos da simetria motora foram avaliados pela quantificação do percentual de uso do membro anterior contralateral (Apêndice A - Figura Suplementar 3 e Vídeo Suplementar 1), que foi próximo a 50% (48,9%) nas análises basais realizadas antes das cirurgias (linha pontilhada). O uso espontâneo do membro anterior contralateral foi significativamente reduzido nos animais tratados com ET-1 ($p < 0,0001$), mas os animais tratados com ET-1 + C2 não foram diferentes dos controles. Os resultados são expressos como média \pm DP. Após o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, foi realizada uma ANOVA de duas vias, seguida do teste post hoc de Tukey. N.S. = não significativo.

5.1.2 C2 recuperou o comprometimento do equilíbrio induzido por ET-1

No teste de equilíbrio em feixe, os escores 1 e 2 são considerados normais (HAUSSER *et al.*, 2018). De acordo, encontramos uma pontuação média de 1,84 para todos os animais avaliados antes da cirurgia. No quarto dia após a cirurgia, os ratos do grupo controle pontuaram em média 2,11, ou seja, equilíbrio visível com todos os membros no feixe

e movimentos exploratórios sem quedas (Figura 13; Apêndice A – Figura Suplementar 4 e [Vídeo Suplementar 2](#)). A ET-1 induziu um prejuízo significativo no equilíbrio dos ratos, medido por déficits de locomoção, maior frequência no uso dos membros ipsilaterais no feixe e quedas durante o teste (Figura 13; Apêndice A – Figura Suplementar 4 e Vídeo Suplementar 2). Os animais isquêmicos (somente ET-1) pontuaram uma média de 2,93, que foi significativamente diferente da pontuação do grupo controle (Figura 13). É importante mencionar que 100% dos animais tratados com ET-1 apresentaram pontuações superiores à média do grupo controle (2,11). Não foram observadas alterações significativas no escore do equilíbrio em feixe nos animais submetidos ao protocolo de isquemia focal (administração de ET-1) e tratados com C2 em relação aos grupos controles, independentemente da dose (Figura 13).

Figura 13 – Desempenho dos animais no teste do equilíbrio em feixe.



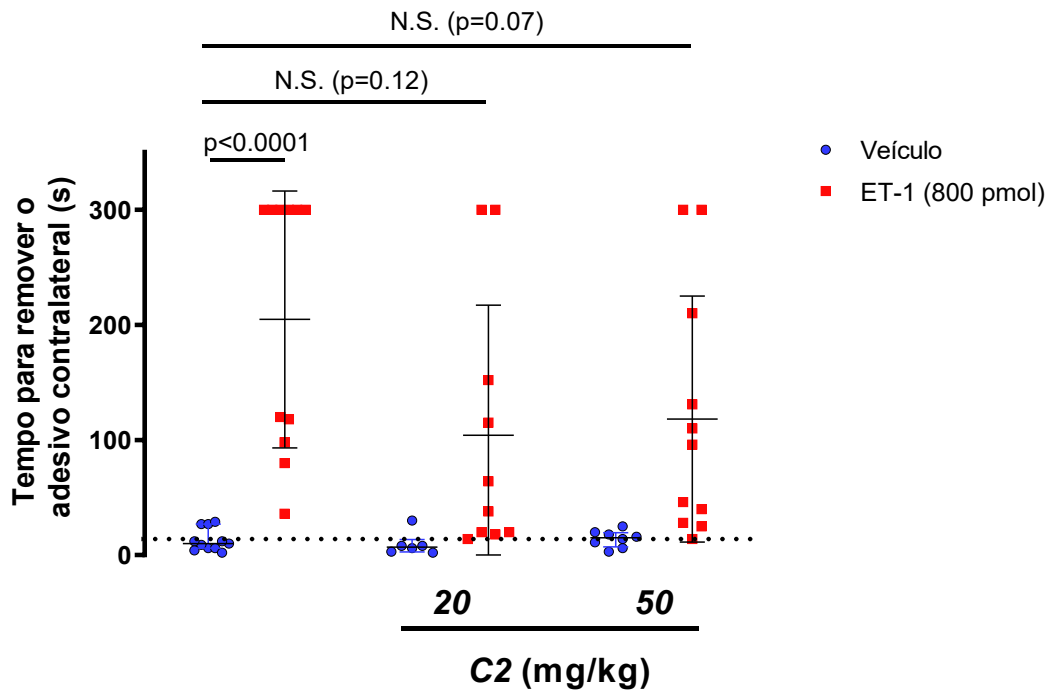
Valor basal antes da cirurgia = 1.84 ······

O equilíbrio em feixe foi pontuado de 1 a 5 (Apêndice A – Figura Suplementar 4 e Vídeo Suplementar 2). As análises realizadas antes das cirurgias indicaram um escore basal médio de 1,84 (linha pontilhada). O escore de equilíbrio foi significativamente aumentado nos animais tratados com ET-1 ($p < 0,01$), mas os animais tratados com ET-1 + C2 (independente da dose) não foram diferentes dos controles. Os resultados são expressos como média \pm DP. Após o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, foi realizada uma ANOVA de duas vias, seguida do teste post hoc de Tukey. N.S. = não significativo.

5.1.3 Efeitos de **C2** no déficit sensório-motor induzido por ET-1

O teste da remoção do adesivo, que é comumente usado para investigar deficiências de extinção tátil relacionadas ao AVC isquêmico, mostrou que os animais do grupo controle removeram o adesivo do membro contralateral em uma média de 13,09 s, valor próximo ao basal antes da cirurgia (14,7 s) (LI *et al.*, 2001; REWELL *et al.*, 2017). Por outro lado, o grupo isquêmico (somente ET-1) levou em média 204,72 s para remover o adesivo do membro contralateral, indicando um significativo déficit sensório-motor (Figura 14 e [Apêndice A – Vídeo Suplementar 3](#)). De fato, vários animais do grupo ET-1 atingiram o tempo máximo avaliado (300 segundos) para remover o adesivo do membro anterior contralateral (Figura 14). Apesar de dois animais de cada grupo tratados com ET-1 + **C2** (20 ou 50 mg/kg) também terem atingido o tempo máximo avaliado e o tempo médio necessário para a retirada do adesivo do membro anterior contralateral ter sido próximo a 100 s, vários animais tratados com ET-1 + **C2** (independente da dose) apresentaram desempenho semelhante ao dos animais do grupo controle (Figura 14). É importante notar que não houve diferenças significativas quando tais grupos foram comparados aos controles; as deficiências aparentes nos animais tratados com ET-1 + **C2** não atingiram significância estatística ($p = 0,12$ e $0,07$). Esses grupos apresentaram grande dispersão de dados e os valores dos indivíduos descritos na Figura 14 sugerem fortemente que **C2** protege parte dos indivíduos submetidos ao protocolo de isquemia focal. O Vídeo Suplementar 3 (Apêndice A) mostra animais representativos dos grupos controle, ET-1 e ET-1 + **C2**.

Figura 14 – Desempenho dos animais do teste da remoção do adesivo.



Valor basal antes da cirurgia = 14,7 s

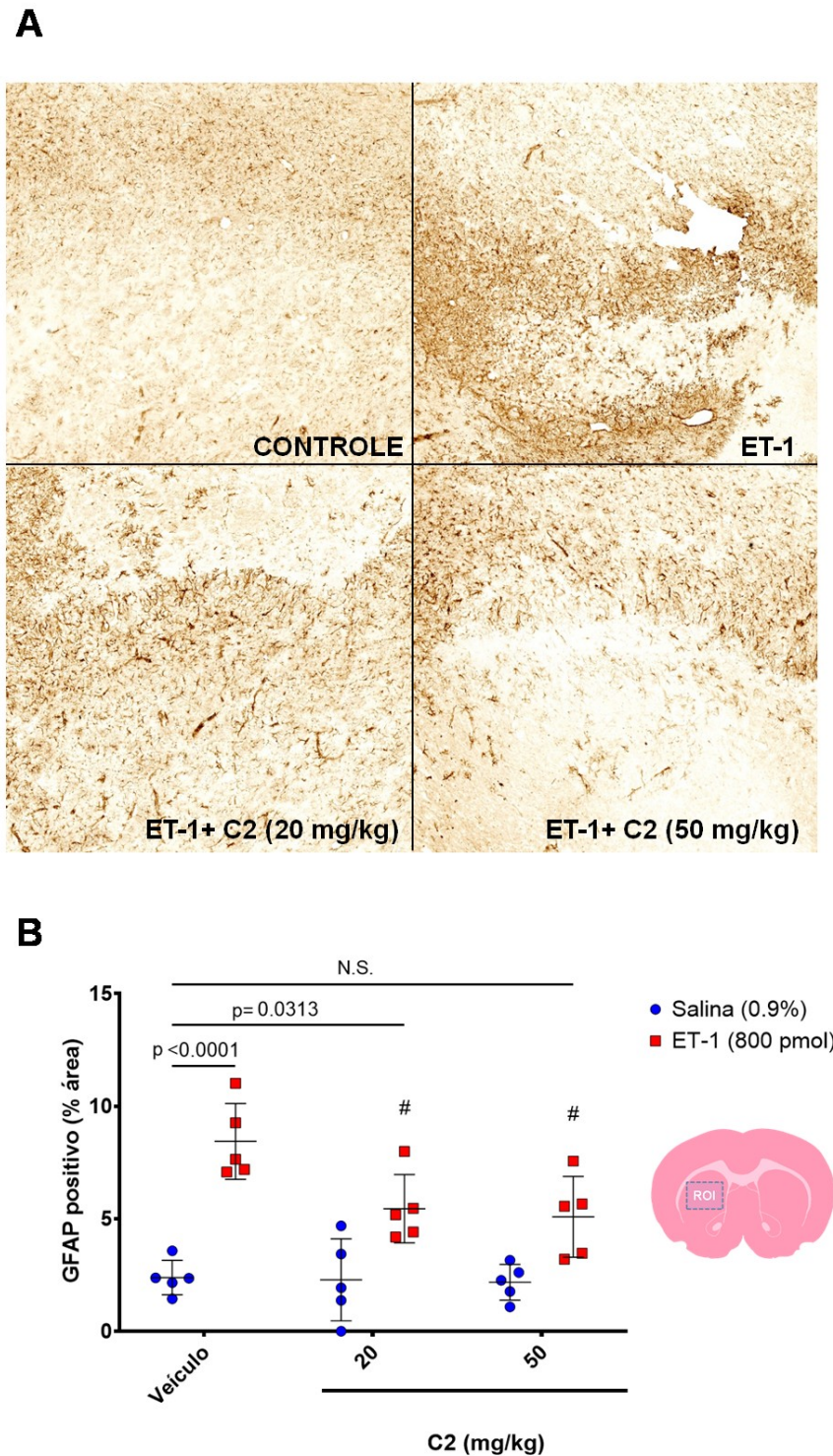
O tempo para remover o adesivo do membro anterior contralateral foi medido (Apêndice A – Vídeo Suplementar 3). As análises basais realizadas antes das cirurgias indicaram um tempo médio de 14,7 s (linha pontilhada) para remoção do adesivo do membro anterior contralateral. Esse tempo aumentou significativamente nos animais tratados com ET-1 ($p < 0,0001$), com vários animais atingindo o tempo máximo avaliado (300 segundos). Embora dois animais de cada grupo tratados com ET-1 + C2 (20 ou 50 mg/kg) também tenham atingido o tempo máximo avaliado, vários animais apresentaram desempenho semelhante ao dos animais controle. As deficiências aparentes nos animais tratados com ET-1 + C2 não atingiram significância estatística ($p = 0,12$ e $0,07$). Os resultados são expressos como média \pm DP. Após o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, foi realizada uma ANOVA de duas vias, seguida do teste post hoc de Tukey. N.S. = não significativo.

5.1.4 C2 inibiu a gliose reativa induzida por ET-1

Após um AVC isquêmico, os astrócitos se tornam reativos, alterando sua morfologia, função e proliferação (SHEN *et al.*, 2021). Tal adaptação tem um papel protetor, favorecendo a remodelação dos circuitos neuronais (MORIZAWA *et al.*, 2017). No entanto, estudos recentes sugerem que a reatividade astrocitária também pode agravar os danos cerebrais durante um AVC isquêmico (SHEN *et al.*, 2021). Considerando o exposto, nós quantificamos astrócitos GFAP positivos através de técnicas imunohistoquímicas. Os déficits comportamentais do grupo isquêmico (ET-1 somente) foram acompanhados de significativa gliose reativa (Figura 15A and B). De fato, tais animais tiveram uma cobertura média de área de astrócitos GFAP positivos de 8,4%, valor três vezes maior que o grupo controle (2,3% de

área coberta). Por outro lado, os animais tratados com ET-1 + **C2** (independentemente da dose) apresentaram diminuição significativa da área coberta com astrócitos GFAP positivos, quando comparados ao grupo isquêmico (Figura 15B). Vale ressaltar que os animais que receberam ET-1 + 50 mg/kg **C2** não diferiram estatisticamente do grupo controle (Figura 15B). Esses resultados indicam que a significativa proliferação de astrócitos reativos pode estar relacionada ao agravamento do quadro isquêmico e aos déficits comportamentais observados nos animais que receberam apenas ET-1. Corroborando essa hipótese, mostramos que animais tratados com ET-1 + **C2** (independente da dose) e com redução significativa da gliose reativa também foram acompanhados de desempenhos comportamentais semelhantes ao grupo controle.

Figura 15– Imagens representativas e quantificação de astrócitos GFAP positivos.



A figura retrata a significativa gliose reativa observada no grupo isquêmico (ET-1 somente, superior direito em A). É possível observar uma redução na gliose reativa nos grupos tratado com **C2** (inferior direito e esquerdo em A) quando comparados com o grupo isquêmico (B). Além disso, animais tratados com 50 mg/kg **C2** não demonstraram diferença estatística do grupo controle. Os resultados são expressos como média \pm DP. Foi realizada uma ANOVA de duas vias, seguida do teste post hoc de Tukey. N.S. = não significativo. # = diferença estatística quando comparado com o grupo isquêmico (ET-1 somente). n=5.

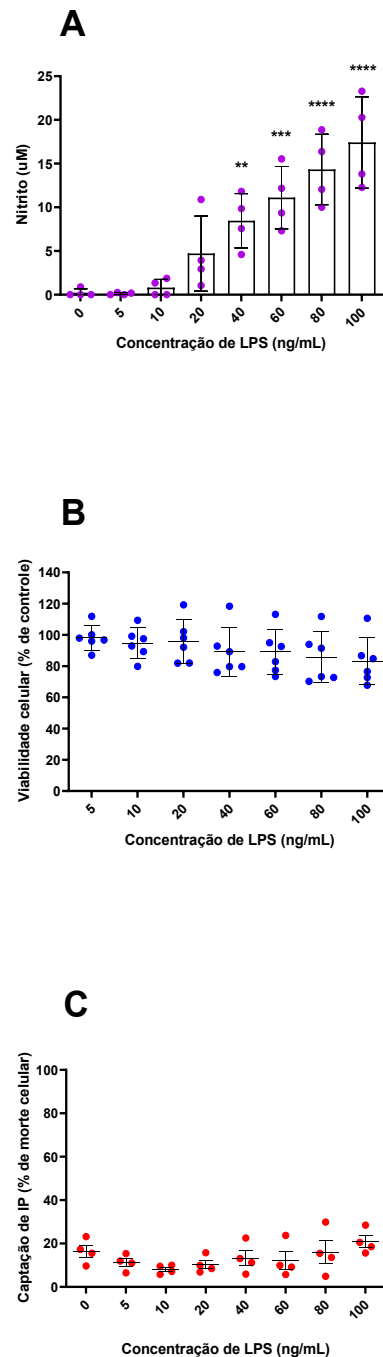
5.2 RESULTADOS DO ESTUDO *IN VITRO*

Resultados referentes à avaliação do potencial citoprotetor do meio condicionado derivado de células BV-2 estimuladas com LPS contra dano ferroptótico induzido por glutamato, e dano oxidativo induzido por *t*-BuOOH.

5.2.1 LPS não é citotóxico e induz ativação microglial

Cultivos microgliais BV-2 foram responsivos a diferentes concentrações de LPS, com aumento significativo na produção de nitrito a partir de 40 ng/mL LPS (Figura 16A). O nitrito é um produto final estável do metabolismo do óxido nítrico (NO), sendo usado para indicar ativação microglial (LIVELY; SCHLICHTER, 2018). As concentrações de LPS utilizadas, que foram capazes de estimular células BV-2, não causaram alterações significativas na viabilidade celular (Figura 16B e C) e, portanto, foram utilizadas neste trabalho como uma abordagem padronizada para obtenção do meio condicionado (MC).

Figura 16 – Efeitos do LPS na liberação de nitrito e na viabilidade e morte celular de culturas microgliais BV-2.

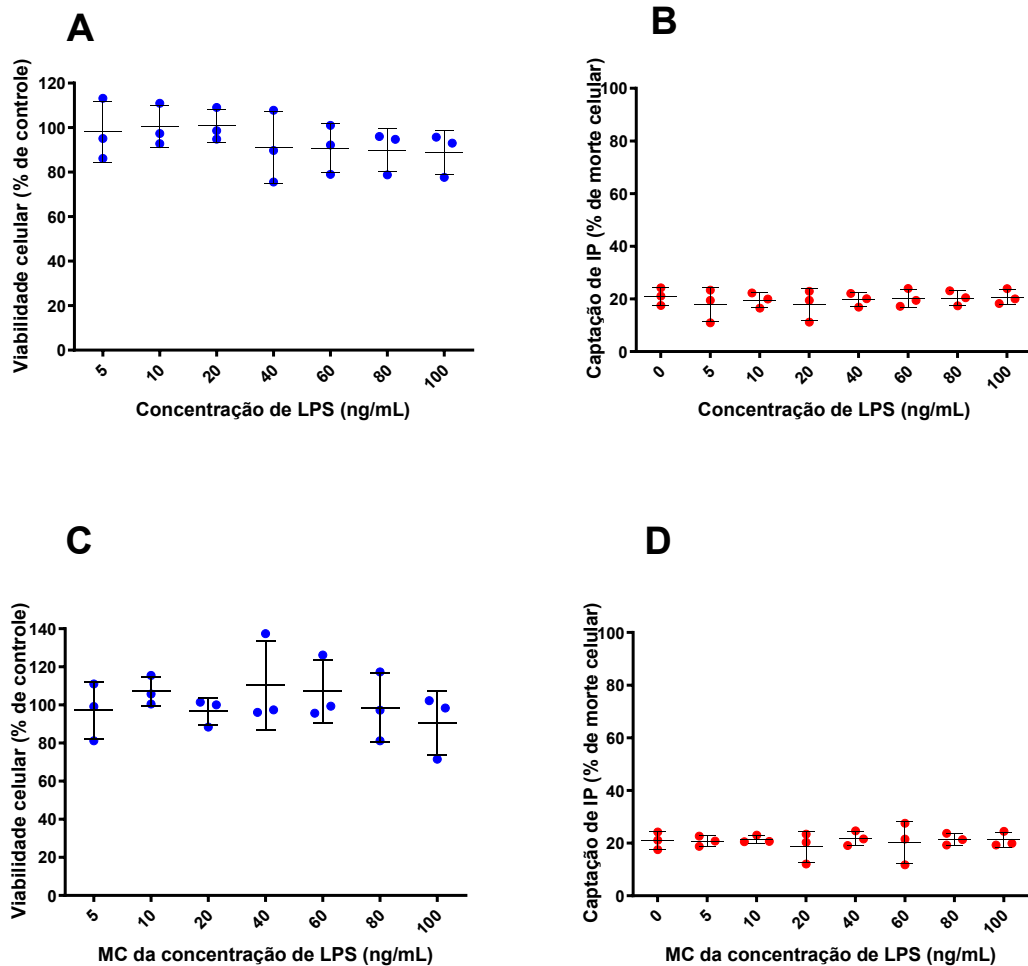


A liberação de nitrito dependente da concentração de LPS nas células BV-2 foi detectada pelo método de Griess, indicando ativação microglial (A). A viabilidade das células BV-2 não foi significativamente afetada pela exposição ao LPS quando comparada ao controle usando os ensaios MTT e IP (B e C). * indica significância estatística em comparação com o grupo controle (células não tratadas). Em C, 100% de morte celular é representada por células tratadas com 0,2% de Triton X-100 por 20 min. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. A e C $n=4$; B $n=6$.

5.2.2 LPS e MC não foram citotóxicos em células HT22

A fim de descartar potenciais efeitos neurotóxicos do LPS e/ou MC derivado de células BV-2, as células neuronais HT22 foram expostas a ambos os desafios potenciais. Descobrimos que a viabilidade das células HT22 não foi comprometida por LPS (Figura 17A e B) ou pelo MC derivado de células BV-2 estimuladas por LPS (Figura 17C e D). Do ponto de vista metodológico e experimental, esses resultados foram necessários para descartar a ocorrência de efeitos citotóxicos diretos do LPS e/ou MC em células HT22 e explorar ainda mais os potenciais efeitos benéficos do MC nesta linhagem celular neuronal.

Figura 17 – Efeito do LPS e MC na viabilidade e morte celular de culturas neuronais HT22.



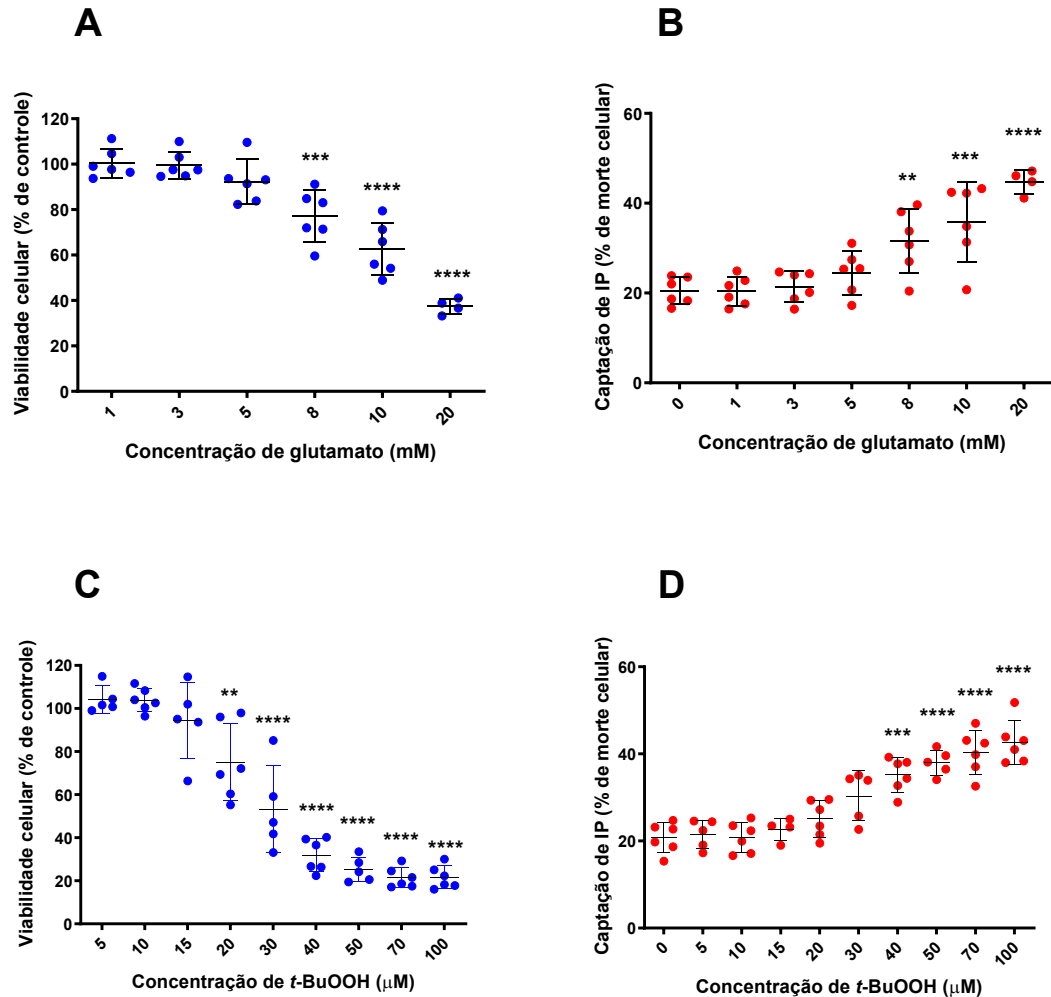
Diferentes concentrações de LPS (A e B) e MC produzidos por células BV-2 estimuladas por LPS (C e D) não afetaram significativamente a viabilidade e morte celular dos cultivos neuronais HT22, quando comparadas ao grupo controle (células não tratadas). 100% de morte: células tratadas com 0,2% de Triton X-100 por 20 min.

n=3.

5.2.3 Glutamato e *t*-BuOOH induziram uma citotoxicidade dependente da concentração em células HT22

Após estabelecer que o MC derivado de células BV-2 estimuladas por LPS não causou efeitos significativos na viabilidade das células HT22, investigamos se este MC teria algum potencial benéfico em cenários oxidativos, incluindo um modelo ferroptótico. Para cumprir este objetivo, primeiro investigamos os efeitos do glutamato e *t*-BuOOH na viabilidade e morte celular. Vale ressaltar que glutamato e *t*-BuOOH foram descritos como causadores de estresse oxidativo e, em particular, o uso de glutamato é um modelo bem estabelecido de ferroptose (BUENO *et al.*, 2020; DIXON *et al.*, 2012; KUČERA *et al.*, 2014). Adicionalmente, *t*-BuOOH pode causar vários tipos de morte celular, como necrose, apoptose, necroptose e partanatos (HWANG *et al.*, 2002; KIM; LEE; PARK, 2014; LOMBARDI *et al.*, 2002; MUTHAIAH *et al.*, 2017; PIAS; AW, 2002; ZHAO *et al.*, 2017). Prejuízos significativos na viabilidade celular e dependentes da concentração foram observados após os paradigmas do glutamato (Figura 18A e B) e *t*-BuOOH (Figura 18C e D) em células HT22. As concentrações 15 mM de glutamato e 30 μ M *t*-BuOOH, que induziram uma perda de aproximadamente 50% na viabilidade das células HT22 após 24 h de tratamento, foram utilizadas nos estudos seguintes (item 4.2.5).

Figura 18 – Efeitos do glutamato e *t*-BuOOH na viabilidade e morte celular de culturas neuronais HT22



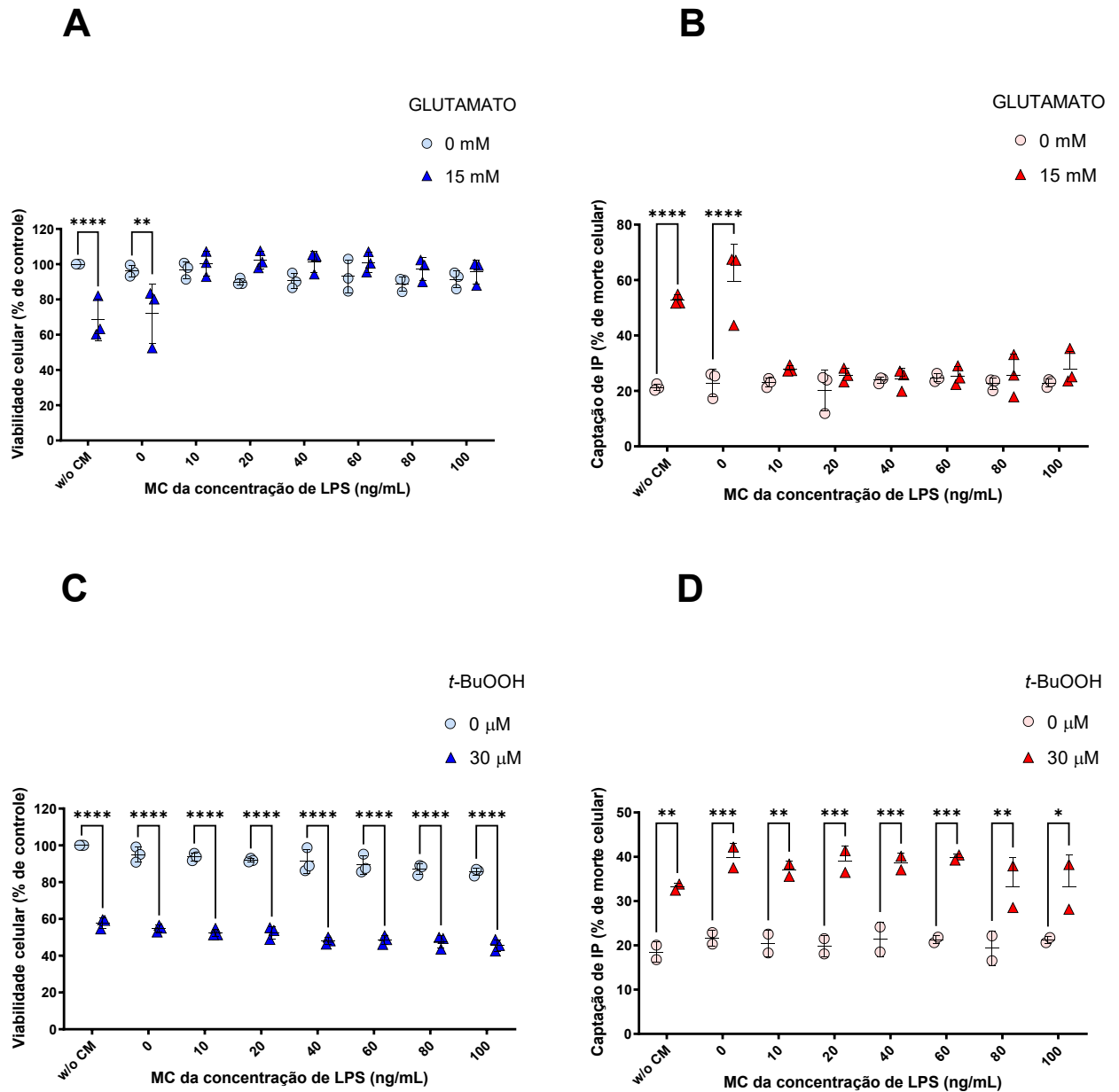
Células HT22 expostas a glutamato (A e B) e *t*-BuOOH (C e D) exibiram um comprometimento progressivo (dependente da concentração) da viabilidade celular em ambas as metodologias testadas (MTT e IP). 100% de morte: células tratadas com 0,2% de Triton X-100 por 20 min. * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (células não tratadas). $n=6$.

5.2.4 MC derivado de células microgлияis estimuladas por LPS protegeu contra a ferroptose induzida por glutamato, mas não contra a toxicidade oxidativa induzida por *t*-BuOOH em células HT22

Por fim, avaliamos se o MC derivado de células microgлияis estimuladas por LPS, que tem reportada riqueza de mediadores (imuno)modulatórios (CHO *et al.*, 2016; CUI *et al.*, 2021; QIN *et al.*, 2016), poderia modular o dano oxidativo induzido por glutamato e *t*-

BuOOH em células HT22. Para este propósito, pré-tratamos células HT22 com o MC derivado de células BV-2 por 6 h e depois expusemos essas células a 15 mM glutamato e 30 μ M de *t*-BuOOH; essas concentrações foram capazes de induzir aproximadamente 50% de perda na viabilidade celular. Notavelmente, as células HT22 pré-tratadas por 6 h com o MC derivado de células BV-2 estimuladas por LPS foram protegidas contra ferroptose induzida por glutamato (Figura 19A e B), embora nenhuma proteção significativa tenha sido observada contra 30 μ M *t*-BuOOH (Figura 19C e D). Como visto na Figura 19 (A e B), estímulos de 10 a 100 ng/mL de LPS foram capazes de gerar um MC que induziu um efeito protetor em células HT22 apenas contra a citotoxicidade do glutamato, apontando para a especificidade dessa proteção em um contexto ferroptótico.

Figura 19 – Efeitos do MC na proteção contra a citotoxicidade induzida por glutamato e *t*-BuOOH em culturas neuronais HT22.



Células HT22 expostas por 6 h ao MC mostraram proteção contra a citotoxicidade induzida por glutamato 15 mM (A e B). No entanto, isso não foi observado no paradigma *t*-BuOOH (C e D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em comparação com os respectivos controles (células não tratadas com glutamato ou *t*-BuOOH). 100% de morte: células tratadas com 0,2% de Triton X-100 por 20 min. $n=3$.

6 DISCUSSÃO

O fármaco alteplase, um ativador do plasminogênio tecidual recombinante, é usado desde 1996 como agente trombolítico, sendo o único tratamento farmacológico aprovado pelo FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) para o AVC isquêmico (BRODERICK; HACKE, 2002). O restabelecimento do fluxo sanguíneo é a principal estratégia utilizada no tratamento do AVC isquêmico; contudo, tal abordagem desconsidera o possível agravamento da lesão tecidual pela reperfusão, isto é, a injúria por isquemia-reperfusão (KHATRI *et al.*, 2012; PICCARDI *et al.*, 2018). Adicionalmente, a utilização da alteplase pode exacerbar a transformação hemorrágica, uma complicação comum do AVC isquêmico caracterizada pela passagem do sangue periférico para o cérebro através da barreira hematoencefálica rompida; tal evento piora o desfecho e aumenta a mortalidade do AVC isquêmico (SPRONK *et al.*, 2021). Apesar do atual manejo agudo do AVC isquêmico, através da terapia de reperfusão, salvar vidas e diminuir as taxas de incapacidade, frequentemente não é possível parar ou reverter o dano neuronal subsequente ao evento isquêmico (LIU *et al.*, 2022). Nesse contexto, uma estratégia terapêutica promissora é a neuroproteção, visando à prevenção do dano neuronal e a recuperação tecidual na região da penumbra isquêmica.

Considerando o exposto, nosso trabalho ofereceu duas estratégias visando a neuroproteção contra a ferroptose, um emergente e promissor alvo terapêutico no contexto das doenças neurodegenerativas e do AVC (YAN *et al.*, 2021). Em nosso primeiro estudo, que contemplou uma etapa *in vitro* (Apêndice B) e outra *in vivo*, exploramos a modulação exógena da ferroptose, através de análogos inéditos do probucol (Apêndice B). Foi avaliado se os compostos **C1** e **C2**, juntamente com o probucol, seriam capazes de induzir um efeito protetor contra a ferroptose induzida por glutamato em culturas neuronais HT22, o que representa um clássico modelo de indução de ferroptose (BUENO *et al.*, 2020). Ambos os análogos foram capazes de gerar um efeito protetor contra a citotoxicidade oxidativa induzida pelo glutamato, mantendo a viabilidade metabólica das culturas e reduzindo a morte celular; tais efeitos protetores não foram observados em células HT22 tratadas com probucol (Apêndice B). É importante ressaltar, que os efeitos protetores dos análogos contra a ferroptose induzida por glutamato em células HT22 foram independentes da restauração dos níveis de GSH, isto é, probucol e os análogos **C1** e **C2** não exerceram efeitos modulatórios contra a depleção de GSH induzida por glutamato (Apêndice B). Considerando que o probucol, que não apresentou efeitos citoprotetores contra a ferroptose induzida por

glutamato, exibiu maior capacidade de doação de hidrogênio em relação ao **C1** e **C2**, os efeitos citoprotetores observados de ambos os análogos parecem não estarem ligados a propriedades antioxidantes/redutoras diretas (Apêndice B). Além disso, embora os mecanismos detalhados que mediam os efeitos protetores de **C1** e **C2** contra a citotoxicidade oxidativa induzida por glutamato não sejam completamente compreendidos, é razoável afirmar que ambos os compostos aumentam a capacidade celular de lidar com desafios oxidantes; esta ideia é reforçada pelo fato de que as células tratadas com **C1** e **C2** exibiram níveis reduzidos de oxidantes que reagem ao DCF após a exposição ao glutamato e menor sensibilidade ao *t*-BuOOH (Apêndice B).

Os resultados promissores dos compostos **C1** e **C2** contra a ferroptose induzida por glutamato *in vitro* motivaram a continuidade da avaliação do potencial farmacológico dos análogos de probucol. A etapa seguinte em nossa proposta de modulação exógena da ferroptose avaliou se tais análogos seriam capazes de recuperar déficits neurológicos induzidos por um modelo experimental *in vivo* de AVC isquêmico. Linhas de evidência recentes indicam que a ferroptose representa um alvo potencial para o tratamento do acidente vascular cerebral (XU *et al.*, 2022). No entanto, se as drogas antiferroptóticas podem proteger contra a lesão do AVC isquêmico em cenários *in vivo* ainda não está claro. Considerando os efeitos protetores significativos de **C1** e **C2** em nosso modelo experimental *in vitro* de ferroptose com células neuronais HT22 (Apêndice B), aventamos a hipótese que tais análogos do probucol poderiam apresentar efeitos neuroprotetores em um modelo *in vivo* de AVC isquêmico. Anteriormente à indução do modelo experimental de AVC isquêmico foi realizada uma avaliação toxicológica preliminar, que teve como objetivo observar se os análogos poderiam induzir efeitos tóxicos aparentes nos animais, como perda de peso e morte. O análogo **C1** visivelmente deteriorou a saúde dos animais, com significativa perda de peso e morte, eventos que não foram observados nos animais expostos ao **C2** (Apêndice B). De fato, **C2** não causou toxicidade aparente nos animais (Apendice A – Figura Suplementar 1), permitindo sua subsequente avaliação em modelo de AVC isquêmico *in vivo*, que foi baseado na administração central do vasoconstritor ET-1 (WINDLE *et al.*, 2006).

Os animais tratados com ET-1 exibiram deficiências significativas em todos os três testes comportamentais (Figuras 12, 13 e 14; Apêndice A – Vídeos suplementares 1, 2 e 3), os quais são classicamente usados para pontuar a gravidade da lesão mediada pelo AVC isquêmico experimental em roedores (BALKAYA *et al.*, 2013; HAUSSER *et al.*, 2018; PLOUGHMAN *et al.*, 2009; REWELL *et al.*, 2017; SCHAAR; BRENNEMAN; SAVITZ,

2010). Notavelmente, **C2** foi capaz de melhorar os resultados comportamentais em animais isquêmicos (Figuras 12, 13 e 14; Apêndice A – Vídeos suplementares 1, 2 e 3), destacando, pela primeira vez, os efeitos benéficos e antiferroptóticos de um análogo do probucol em cenário *in vivo*. Do ponto de vista farmacológico, esse resultado pode ser relevante considerando a necessidade de agentes antiferroptóticos com boas propriedades de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) (HOFMANS *et al.*, 2016). O efeito benéfico do **C2** em um modelo *in vivo* de AVC isquêmico está de acordo com o fato de que o probucol e alguns análogos exibem boas propriedades de ADME *in vivo* (FELLIN *et al.*, 1986; TARDIF *et al.*, 2008), destacando os análogos de probucol como uma classe promissora de compostos para tratar condições patológicas relacionadas à ferroptose.

A gliose reativa, que representa uma reação (pato)fisiológica dos astrócitos à lesão cerebral, também foi relatada após AVC isquêmico (SHEN *et al.*, 2021). Notavelmente, no AVC isquêmico vários fatores (a própria lesão, o ambiente isquêmico, ruptura da barreira hematoencefálica e resposta inflamatória) podem afetar a extensão e a qualidade da gliose reativa (PEKNY; NILSSON, 2005), o que é comumente quantificado pela análise da expressão tecidual da proteína GFAP. É importante ressaltar que a inibição da gliose reativa está associada com a melhora de parâmetros cognitivos e a redução do volume do infarto em modelos de AVC isquêmico induzidos pela oclusão da artéria cerebral média e por injeções corticais de ET-1 em ratos (ZEPEDA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019). Em nossos resultados, observamos um aumento significativo na expressão de GFAP estriatal 7 dias após o início do episódio isquêmico (Figura 15), indicando a ocorrência de gliose reativa no corpo estriado de ratos tratados com ET-1. Os efeitos de melhoria induzidos por **C2** na expressão de GFAP estriatal (Figura 15) reforçam suas propriedades neuroprotetoras em nosso modelo *in vivo* e destacam a ligação entre os parâmetros comportamentais avaliados e a gliose reativa em ratos tratados com ET-1.

Em conjunto, demonstramos que um novo análogo de probucol (**C2**), com propriedades antiferroptóticas *in vitro* (Apêndice B), foi capaz de induzir efeitos protetores contra um AVC isquêmico experimental *in vivo*. Corroborando com os achados *in vitro*, **C2**, que não induziu toxicidade aparente aos animais, recuperou os déficits comportamentais causados pela injeção central de ET-1, levando a melhorias funcionais significativas. Os efeitos induzidos pelo **C2** em nosso modelo *in vivo* estão alinhados com as boas propriedades ADME já relatadas do probucol e outros análogos, tais características destacam o **C2** como

uma nova droga em potencial para tratar o AVC isquêmico ou outras condições patológicas relacionadas à ferroptose.

A ferroptose é um tipo de morte celular descrita recentemente, logo seus mecanismos e vias regulatórias não são totalmente esclarecidos. De fato, nossa segunda estratégia modulatória da ferroptose, que demonstrou o potencial citoprotetor de produtos da ativação microglial contra a toxicidade oxidativa do glutamato *in vitro*, constitui-se uma abordagem inexplorada pela literatura. Além disso, nosso trabalho indicou que os produtos da ativação microglial M1 podem estar relacionados à indução de efeitos benéficos, contrariando a classificação detrimental atribuída ao estado M1. A maior parte da literatura científica disponível aponta para uma classificação binária da ativação microglial, assumindo dois estados celulares opostos caracterizados por um perfil pró-inflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2) (WANG, Q. *et al.*, 2021). Embora algumas linhas de evidência indiquem que tais estados opostos e polarizados não representam certas condições (pato) fisiológicas no cérebro (BACHILLER *et al.*, 2018; RANSOHOFF, 2016), a nomenclatura M1/M2 é comumente aceita e utilizada. O LPS é um indutor clássico do estado microglial M1, geralmente associado a efeitos deletérios em condições neuropatológicas; sendo desejável o estado M2 (SONG; SUK, 2017). No entanto, nossos resultados demonstraram que moléculas presentes no meio condicionado (MC) derivadas de uma ativação microglial clássica M1 foram capazes de induzir um fenótipo resistente à ferroptose em neurônios, indicando que o estado M1 não está necessariamente ligado à neurotoxicidade. Por outro lado, nossos resultados indicam que a ativação microglial controlada em direção ao estado M1 pode ser benéfica, pelo menos em alguns cenários específicos. Considerando o papel da ferroptose nas doenças neurodegenerativas (YAN *et al.*, 2021), nossos resultados representam um achado relevante.

A micróglia ativada pode liberar uma ampla gama de substâncias; células BV-2 tratadas com 100 ng/mL de LPS por 24 h (mesma concentração/tempo de estímulo utilizado em nosso trabalho) tiveram um aumento significativo na produção de NO e na expressão de mRNA de IL-6, IL-1 β , TNF- α e iNOS (DE CARIS *et al.*, 2020; YAN *et al.*, 2019). Vale ressaltar que um aumento significativo de TNF- α e IL-6 no meio condicionado (MC) também foi induzido com 100 ng/mL de LPS em células BV-2 (CHO *et al.*, 2016). Nossos dados sugerem que a estimulação causada por essas substâncias citadas e outras derivadas da ativação microglial podem induzir efeitos benéficos nos neurônios. De acordo com nossos achados, um estudo relatou que o meio condicionado derivado de micróglia primária de

camundongo estimulada com LPS apresentou níveis mais elevados de TNF- α e IL-6, e que tal MC foi capaz de aumentar a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (ZHOU; SPITTAU, 2018). De particular importância, este estudo mostrou que a presença física de células gliais é necessária para a indução de neurotoxicidade, ao comparar culturas enriquecidas de neurônios (baixa porcentagem de astrócitos e microglia) e culturas neuro-gliais (alta porcentagem de astrócitos e microglia, e semelhante a condições *in vivo*) expostos a 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (ZHOU; SPITTAU, 2018). Esta observação suporta nossa hipótese de que a ativação microglial em direção a M1 não é necessariamente deletéria, e sugere que os efeitos negativos atribuídos ao estado M1 podem ser o resultado da interação complexa entre células gliais e neurônios. Indiretamente, este relato fornece uma razão para a baixa toxicidade do CM em células HT22 observadas em nosso trabalho.

Dentro de um cenário patológico e neurodegenerativo caracterizado pela crônica ativação microglial, há um inegável papel lesivo dos mediadores pró-inflamatórios liberados pela micróglia (HICKMAN *et al.*, 2018). No entanto, é razoável argumentar que, sob certas condições, os produtos da ativação microglial M1 podem ser neuroprotetores. Por exemplo, TNF-alfa (100 ng/mL) protegeu culturas neuronais corticais contra lesão induzida por glutamato, ácido N-metil-d-aspartico (NMDA) e privação de glicose (CARLSON *et al.*, 1999; CHENG; CHRISTAKOS; MATTSON, 1994). Da mesma forma, neurônios pré-tratados com IL-1beta (25 ng/mL) exibiram resistência contra citotoxicidade induzida por NMDA (CARLSON *et al.*, 1999). Finalmente, células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas com IL-6 (de 0,025 a 25 ng/mL) resistiram ao dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (BISSONNETTE *et al.*, 2004). Além disso, IL-6 (10 ng/mL) protegeu contra neurotoxicidade induzida por 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) em neurônios (AKANEYA; TAKAHASHI; HATANAKA, 1995). Entretanto, não devemos excluir a possibilidade de que uma substância de natureza não peptídica ou não proteica contribua para os efeitos neuroprotetores. Corroborando essa hipótese, um estudo relatou que a inativação de proteínas pelo calor e por peptidases/proteases não foi capaz de inibir totalmente o efeito protetor do MC (POLAZZI *et al.*, 2009). Nesse cenário, nosso estudo é o primeiro a mostrar que o MC derivado de células microgliais ativadas por LPS tem efeitos protetores contra a ferroptose em células neuronais.

Finalmente, precisamos explorar as hipóteses para os efeitos contrastantes induzidos pelo MC contra um dano oxidativo (*t*-BuOOH) e um ferroptótico (glutamato). As vias pelas quais *t*-BuOOH causa dano oxidativo não são totalmente compreendidas nas células HT22. É relatado que as células HT22 expostas a 40, 70 ou 100 μM *t*-BuOOH exibem disfunção

mitocondrial e geração de ânion superóxido (QUISPE *et al.*, 2018); *t*-BuOOH induziu morte celular necrótica em fibroblastos murinos (NIH3T3) e queratinócitos humanos (HaCaT), com observado aumento na peroxidação lipídica e EROs citosólicos, os quais foram sensíveis à ferrostatina-1 e liproxstatina-1 (WENZ *et al.*, 2018). Curiosamente, a ferroptose foi causada independentemente de outros danos induzidos por *t*-BuOOH, como perda de potencial de membrana mitocondrial e quebras de fita dupla do DNA, indicando assim a participação de outros tipos de morte celular que não a ferroptose (WENZ *et al.*, 2018). Um estudo com Neuro-2a (neuroblastoma de camundongo) e SH-SY5Y (neuroblastoma humano) demonstrou que o tratamento com *t*-BuOOH foi capaz de induzir a morte celular via apoptose (ZHAO *et al.*, 2005). Embora a ferroptose também tenha sido relatada como um tipo potencial de morte celular após a exposição a *t*-BuOOH - pelo menos em alguns tipos celulares específicos, como células PC12 (WU *et al.*, 2018) - é bem conhecido que necrose, apoptose, necroptose e parthanatos também representam eventos resultantes da exposição a *t*-BuOOH (HWANG *et al.*, 2002; KIM; LEE; PARK, 2014; LOMBARDI *et al.*, 2002; MUTHAIAH *et al.*, 2017; PIAS; AW, 2002; ZHAO *et al.*, 2017). Apesar de o glutamato ser um indutor clássico de morte celular excitotóxica em neurônios (MEHTA *et al.*, 2013; YOO *et al.*, 2017), tal evento só é possível em células contendo receptor de glutamato N-metil D-aspartato (NMDA) (LAI; ZHANG; WANG, 2014). De fato, a falta de receptores NMDA nas células HT22 torna essa linhagem celular uma ferramenta clássica para investigar ferroptose induzida por glutamato (TOBABEN *et al.*, 2011), que está ligada à depleção de glutatona devido à diminuição da captação de cistina via sistema Xc⁻ (YAN *et al.*, 2021). Embora nossos protocolos tenham sido baseados em intensidades semelhantes de desafios deletérios (aproximadamente uma redução de 40% na viabilidade celular após exposições a 15 mM de glutamato ou 30 μM de *t*-BuOOH), o efeito protetor do MC derivado de células BV2 ativadas foi observado apenas no modelo baseado em glutamato, apontando para uma potencial especificidade de proteção contra desafios ferroptóticos.

Em resumo, nossos resultados mostram que as substâncias derivadas da ativação microglial M1 não são necessariamente tóxicas, acrescentando evidências ao debate contra a classificação dicotômica com funções pré-estabelecidas para M1 e M2 (neurotóxica e neuroprotetora, respectivamente). Em conjunto, nossos dados revelam uma possibilidade terapêutica inexplorada, ou seja, a modulação da ferroptose através de produtos da ativação microglial, lançando luz sobre um novo evento relacionado à comunicação benéfica entre neurônios e micróglia.

Nossa segunda estratégia experimental explorou o potencial modulatório do MC contra a ferroptose induzida por glutamato. Apesar do MC ser administrado de forma exógena nas células HT22, tal paradigma pode mimetizar, ao menos parcialmente, uma situação endógena. Esse estudo foi dividido em três etapas principais, isto é, (i) produção do MC em culturas microgliais BV-2, (ii) tratamento de culturas neuronais HT22 com o MC e (iii) indução de insulto ferrotóxico com glutamato em células HT22; tais eventos (ativação microglial e toxicidade oxidativa do glutamato) podem ser desencadeados endogenamente em um AVC isquêmico. Os efeitos protetores induzidos pelo MC em culturas neuronais HT22 indicam que a ativação microglial e o pré-condicionamento de neurônios com produtos microgliais possuem ação antiferroptótica. Contudo, a magnitude desse efeito pode estar relacionada com as condições controladas e isoladas de nossos protocolos experimentais. Porém, é razoável argumentar que num AVC isquêmico há uma resposta endógena microglial, que pode ter papel protetor na patologia, mas que é insuficiente, tendo em vista a natureza altamente detrimental do AVC isquêmico. Um exemplo de resposta defensiva insuficiente é a transcrição de selenoproteínas protetoras mediante estímulo ferrotóxico em modelos *in vitro* e *in vivo* de AVC hemorrágico, tal resposta torna-se eficiente após a entrega farmacológica exógena de selênio, mitigando os efeitos deletérios da ferroptose (ALIM *et al.*, 2019). Nesse sentido, nosso estudo traz novas possibilidades terapêuticas, pois as sinalizações exercidas pelas moléculas derivadas da ativação microglial, as quais induziram uma resposta protetora *in vitro*, poderão ser identificadas e moduladas farmacologicamente no futuro com o objetivo de mitigar ou inibir a ferroptose presente nas neuropatologias.

Considerando o exposto, a utilização de terapias exógenas que objetivam dar suporte as micróglia e astrócitos, a fim de modular a intensidade e duração de seus estágios reativos, bem como a liberação de mediadores inflamatórios, visando a neuroproteção, pode representar uma estratégia promissora. Por exemplo, induzir e controlar farmacologicamente a ativação microglial na zona de penumbra, a fim de extrair controladamente os benefícios protetores dessa sinalização, evitando o agravamento da lesão isquêmica. Semelhantemente, em nossa primeira estratégia experimental, observamos que a redução da reatividade astrocitária, induzida exogenamente pela administração intraperitoneal de C2 em ratos foi associada à melhora de déficits comportamentais causados pelo modelo experimental de AVC isquêmico. Contudo, o efeito observado na gliose reativa pode ser indireto, isto é, não há evidências de que derivados sintéticos do probucol possuam efeitos diretos em astrócitos. Por outro lado, a literatura disponível indica que tais compostos protegem contra danos oxidativos

e ferroptóticos dando suporte às defesas antioxidantes, como aumento da atividade da glutathiona peroxidase (BUENO *et al.*, 2020; NAIME *et al.*, 2021; QUISPE *et al.*, 2022), e isso representa uma estratégia promissora para o tratamento do AVC isquêmico (JIN *et al.*, 2021). Adicionalmente, o eixo cist(e)ina/GSH/GPX4 é o principal sistema regulador da ferroptose em mamíferos (CONRAD; LORENZ; PRONETH, 2021). A diminuição da carga oxidante, por mecanismos endógenos e/ou exógenos, tem como consequência a diminuição da morte celular e lesão tecidual, o que pode impactar diretamente o nível de reatividade de micróglia e astrócitos, visto que tais células reconhecem padrões moleculares associados ao perigo (DONG *et al.*, 2021). Por fim, a modulação da ferroptose visando à neuroproteção no AVC isquêmico é complexa, pois é multifatorial e muitos eventos que permeiam essa via ainda são desconhecidos. Contudo, as estratégias experimentais e resultados fornecidos por esse trabalho, (i) tratamento em potencial contra danos oxidativos e ferroptóticos com novo análogo do probucol em modelo de AVC isquêmico, e (ii) indução de efeito protetor contra ferroptose em modelo *in vitro* através de produtos derivados da ativação microglial, evidenciam a presença de possíveis relações benéficas entre micróglia e neurônios, e motivam o desenvolvimento de moléculas inéditas, renovando as oportunidades terapêuticas contra o AVC isquêmico.

7 CONCLUSÕES

Nosso trabalho ofereceu duas estratégias para a modulação da ferroptose visando à proteção neuronal. Na primeira, o composto inédito **C2**, com evidenciada ação antiferroptótica *in vitro*, mitigou os danos causados pelo modelo experimental de AVC isquêmico induzido por ET-1 em ratos. **C2** foi capaz de proteger os animais contra os déficits comportamentais induzidos pela isquemia cerebral, reduzindo a gliose reativa. Considerando a participação da ferroptose no AVC isquêmico, as propriedades antiferroptóticas do **C2** *in vitro* e os achados *in vivo* deste trabalho, fomos capazes de destacar o potencial terapêutico deste novo análogo para o tratamento do AVC isquêmico.

Por fim, exploramos a comunicação entre micróglia e neurônio no contexto da ferroptose em condições *in vitro*. Utilizando o meio condicionado derivado de culturas microgliais estimuladas por LPS, fomos capazes de induzir um significativo efeito protetor em culturas neuronais contra a morte celular induzida por glutamato, dessa forma,

apresentando uma alternativa inédita para a modulação experimental da ferroptose. Em conjunto, esperamos que nossos resultados contribuam para o estabelecimento de novas perspectivas para a modulação da ferroptose visando a neuroproteção em neuropatologias, incluindo o AVC isquêmico.

REFERÊNCIAS

- ABEYSINGHE, R. D.; ROBERTS, P. J.; COOPER, C. E.; MACLEAN, K. H. *et al.* The Environment of the Lipoxygenase Iron Binding Site Explored with Novel Hydroxypyridinone Iron Chelators (*). **Journal of Biological Chemistry**, 271, n. 14, p. 7965-7972, 1996.
- AGMON, E.; SOLON, J.; BASSEREAU, P.; STOCKWELL, B. R. Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 5155, 2018/03/26 2018.
- AKANEYA, Y.; TAKAHASHI, M.; HATANAKA, H. Interleukin-1 β Enhances Survival and Interleukin-6 Protects against MPP⁺ Neurotoxicity in Cultures of Fetal Rat Dopaminergic Neurons. **Experimental Neurology**, 136, n. 1, p. 44-52, 1995/11/01/ 1995.
- ALIM, I.; CAULFIELD, J. T.; CHEN, Y.; SWARUP, V. *et al.* Selenium Drives a Transcriptional Adaptive Program to Block Ferroptosis and Treat Stroke. **Cell**, 177, n. 5, p. 1262-1279.e1225, 2019.
- BACHILLER, S.; JIMÉNEZ-FERRER, I.; PAULUS, A.; YANG, Y. *et al.* Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 12, 2018-December-18 2018. Review.
- BALKAYA, M.; KRÖBER, J. M.; REX, A.; ENDRES, M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 33, n. 3, p. 330-338, 2013.
- BISSONNETTE, C. J.; KLEGERIS, A.; MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Interleukin 1 α and interleukin 6 protect human neuronal SH-SY5Y cells from oxidative damage. **Neuroscience Letters**, 361, n. 1, p. 40-43, 2004/05/06/ 2004.
- BRODERICK, J. P.; HACKE, W. Treatment of Acute Ischemic Stroke. **Circulation**, 106, n. 12, p. 1563-1569, 2002.
- BROTT, T.; BOGOUSSLAVSKY, J. Treatment of Acute Ischemic Stroke. **New England Journal of Medicine**, 343, n. 10, p. 710-722, 2000.

BROUGHTON, B.; LIM, R.; ARUMUGAM, T.; DRUMMOND, G. *et al.* Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 6, 2013-January-17 2013. Review.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, 111, n. 6, p. 483-495, 2009/07/01/2009.

BU, Z.-Q.; YU, H.-Y.; WANG, J.; HE, X. *et al.* Emerging Role of Ferroptosis in the Pathogenesis of Ischemic Stroke: A New Therapeutic Target? **ASN neuro**, 13, p. 17590914211037505-17590914211037505, Jan-Dec 2021.

BUENO, D. C.; CANTO, R. F. S.; DE SOUZA, V.; ANDREGUETTI, R. R. *et al.* New Probucol Analogues Inhibit Ferroptosis, Improve Mitochondrial Parameters, and Induce Glutathione Peroxidase in HT22 Cells. **Molecular Neurobiology**, 57, n. 8, p. 3273-3290, 2020/08/01 2020.

CAMPBELL, B. C. V.; DE SILVA, D. A.; MACLEOD, M. R.; COUTTS, S. B. *et al.* Ischaemic stroke. **Nature Reviews Disease Primers**, 5, n. 1, p. 70, 2019/10/10 2019.

CARLSON, N. G.; WIEGGEL, W. A.; CHEN, J.; BACCHI, A. *et al.* Inflammatory Cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α Impart Neuroprotection to an Excitotoxin Through Distinct Pathways. **The Journal of Immunology**, 163, n. 7, p. 3963-3968, 1999.

CASO, J. R.; PRADILLO, J. M.; HURTADO, O.; LORENZO, P. *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. **Circulation**, 115, n. 12, p. 1599-1608, Mar 27 2007.

CASTELLANOS, M.; PUIG, N.; CARBONELL, T.; CASTILLO, J. *et al.* Iron intake increases infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Research**, 952, n. 1, p. 1-6, 2002/10/11/ 2002.

CHEN, Z.; TRAPP, B. D. Microglia and neuroprotection. **Journal of Neurochemistry**, 136, n. S1, p. 10-17, 2016.

CHENG, B.; CHRISTAKOS, S.; MATTSON, M. P. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. **Neuron**, 12, n. 1, p. 139-153, 1994.

CHO, N.; MOON, E. H.; KIM, H. W.; HONG, J. *et al.* Inhibition of Nitric Oxide Production in BV2 Microglial Cells by Triterpenes from *Tetrapanax papyriferus*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 21, n. 4, p. 459-459, 2016.

CHUNG, W.-S.; CLARKE, L. E.; WANG, G. X.; STAFFORD, B. K. *et al.* Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. **Nature**, 504, n. 7480, p. 394-400, 2013.

COLLABORATORS, G. B. D. L. R. o. S.; FEIGIN, V. L.; NGUYEN, G.; CERCY, K. *et al.* Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. **The New England journal of medicine**, 379, n. 25, p. 2429-2437, 2018.

COLLE, D.; HARTWIG, J. M.; ANTUNES SOARES, F. A.; FARINA, M. ProbucoL modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. **Brain Research Bulletin**, 87, n. 4, p. 397-405, 2012/03/10/ 2012.

COLLE, D.; SANTOS, D. B.; HARTWIG, J. M.; GODOI, M. *et al.* Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. **Molecular Neurobiology**, 53, n. 2, p. 1280-1295, 2016/03/01 2016.

COLLE, D.; SANTOS, D. B.; MOREIRA, E. L. G.; HARTWIG, J. M. *et al.* ProbucoL Increases Striatal Glutathione Peroxidase Activity and Protects against 3-Nitropropionic Acid-Induced Pro-Oxidative Damage in Rats. **PLOS ONE**, 8, n. 6, p. e67658, 2013.

CONRAD, M.; LORENZ, S. M.; PRONETH, B. Targeting Ferroptosis: New Hope for As-Yet-Incurable Diseases. **Trends in Molecular Medicine**, 27, n. 2, p. 113-122, 2021.

CUI, Y.; ZHANG, Z.; ZHOU, X.; ZHAO, Z. *et al.* Microglia and macrophage exhibit attenuated inflammatory response and ferroptosis resistance after RSL3 stimulation via increasing Nrf2 expression. **Journal of Neuroinflammation**, 18, n. 1, p. 249, 2021/10/30 2021.

DÁVALOS, A.; FERNANDEZ-REAL, J. M.; RICART, W.; SOLER, S. *et al.* Iron-related damage in acute ischemic stroke. **Stroke**, 25, n. 8, p. 1543-1546, Aug 1994.

DE CARIS, M. G.; GRIECO, M.; MAGGI, E.; FRANCIOSO, A. *et al.* Blueberry Counteracts BV-2 Microglia Morphological and Functional Switch after LPS Challenge. **Nutrients**, 12, n. 6, p. 1830, 2020.

DING, H.; YAN, C. Z.; SHI, H.; ZHAO, Y. S. *et al.* Hepcidin is involved in iron regulation in the ischemic brain. **PLoS One**, 6, n. 9, p. e25324, 2011.

DITTMAR, M.; SPRUSS, T.; SCHUIERER, G.; HORN, M. External Carotid Artery Territory Ischemia Impairs Outcome in the Endovascular Filament Model of Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. **Stroke**, 34, n. 9, p. 2252-2257, 2003.

DIXON, Scott J.; LEMBERG, Kathryn M.; LAMPRECHT, Michael R.; SKOUTA, R. *et al.* Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. **Cell**, 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.

DIXON, S. J.; STOCKWELL, B. R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. **Nature Chemical Biology**, 10, n. 1, p. 9-17, 2014/01/01 2014.

DOLL, S.; CONRAD, M. Iron and ferroptosis: A still ill-defined liaison. **IUBMB Life**, 69, n. 6, p. 423-434, Jun 2017.

DONG, R.; HUANG, R.; WANG, J.; LIU, H. *et al.* Effects of Microglial Activation and Polarization on Brain Injury After Stroke. **Frontiers in Neurology**, 12, 2021-July-01 2021. Review.

ESCARTIN, C.; GALEA, E.; LAKATOS, A.; O'CALLAGHAN, J. P. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, 24, n. 3, p. 312-325, 2021/03/01 2021.

FARACO, G.; MORAGA, A.; MOORE, J.; ANRATHER, J. *et al.* Circulating Endothelin-1 Alters Critical Mechanisms Regulating Cerebral Microcirculation. **Hypertension**, 62, n. 4, p. 759-766, 2013.

FELLIN, R.; GASPAROTTO, A.; VALERIO, G.; BAIOCCHI, M. R. *et al.* Effect of probucol treatment on lipoprotein cholesterol and drug levels in blood and lipoproteins in familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 59, n. 1, p. 47-56, Jan 1986.

FERRO, J. M.; CAEIRO, L.; FIGUEIRA, M. L. Neuropsychiatric sequelae of stroke. **Nature Reviews Neurology**, 12, n. 5, p. 269-280, 2016/05/01 2016.

FERRY, B.; GERVASONI, D.; VOGT, C. Stereotaxic Approach of a Target Structure. *In*: FERRY, B.; GERVASONI, D., *et al.* (Ed.). **Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent: Handbook on Best Practices**. Paris: Springer Paris, 2014. p. 69-86.

FORCINA, G. C.; DIXON, S. J. GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis. 19, n. 18, p. e1800311, Sep 2019.

FUKUI, M.; SONG, J.-H.; CHOI, J.; CHOI, H. J. *et al.* Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. **European Journal of Pharmacology**, 617, n. 1, p. 1-11, 2009/09/01/ 2009.

FUXE, K.; BJELKE, B.; ANDBJER, B.; GRAHN, H. *et al.* Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. **Neuroreport**, 8, n. 11, p. 2623-2629, Jul 28 1997.

GALARIS, D.; BARBOUTI, A.; PANTOPOULOS, K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, 1866, n. 12, p. 118535, 2019/12/01/ 2019.

GANZ, T. Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. **Cell Metab**, 7, n. 4, p. 288-290, Apr 2008.

GELDERBLUM, M.; SOBEY, C. G.; KLEINSCHNITZ, C.; MAGNUS, T. Danger signals in stroke. **Ageing Research Reviews**, 24, p. 77-82, 2015/11/01/ 2015.

GILL, D.; MONORI, G.; TZOULAKI, I.; DEGHAN, A. Iron Status and Risk of Stroke. **Stroke**, 49, n. 12, p. 2815-2821, Dec 2018.

GONZÁLEZ, R. G. Imaging-guided acute ischemic stroke therapy: From "time is brain" to "physiology is brain". **AJNR. American journal of neuroradiology**, 27, n. 4, p. 728-735, 2006.

HAUSSER, N.; JOHNSON, K.; PARSLEY, M. A.; GUPTARAK, J. *et al.* Detecting Behavioral Deficits in Rats After Traumatic Brain Injury. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 131, p. 56044, 2018.

HELLWIG, S.; HEINRICH, A.; BIBER, K. The brain's best friend: microglial neurotoxicity revisited. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 7, n. 71, 2013-May-16 2013. Review.

HICKMAN, S.; IZZY, S.; SEN, P.; MORSETT, L. *et al.* Microglia in neurodegeneration. **Nature Neuroscience**, 21, n. 10, p. 1359-1369, 2018/10/01 2018.

HIDER, R. C.; KONG, X. Iron speciation in the cytosol: an overview. **Dalton Trans**, 42, n. 9, p. 3220-3229, Mar 7 2013.

HOFMANS, S.; BERGHE, T. V.; DEVISSCHER, L.; HASSANNIA, B. *et al.* Novel Ferroptosis Inhibitors with Improved Potency and ADME Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, 59, n. 5, p. 2041-2053, 2016/03/10 2016.

HUANG, L.; MCCLATCHY, D. B.; MAHER, P.; LIANG, Z. *et al.* Intracellular amyloid toxicity induces oxytosis/ferroptosis regulated cell death. **Cell Death & Disease**, 11, n. 10, p. 828, 2020/10/06 2020.

HWANG, J.-M.; WANG, C.-J.; CHOU, F.-P.; TSENG, T.-H. *et al.* Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. **Archives of Toxicology**, 76, n. 11, p. 664-670, 2002/11/01 2002.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nature Medicine**, 17, n. 7, p. 796-808, 2011/07/01 2011.

IIZUMI, T.; TAKAHASHI, S.; MASHIMA, K.; MINAMI, K. *et al.* A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. **Journal of Neuroinflammation**, 13, n. 1, p. 99, May 04 2016. journal article.

INGRASSIA, R.; LANZILLOTTA, A.; SARNICO, I.; BENARESE, M. *et al.* 1B/(-)IRE DMT1 expression during brain ischemia contributes to cell death mediated by NF- κ B/RelA acetylation at Lys310. **PloS one**, 7, n. 5, p. e38019-e38019, 2012.

JIANG, X.; STOCKWELL, B. R.; CONRAD, M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 22, n. 4, p. 266-282, 2021/04/01 2021.

JIN, Y.; ZHUANG, Y.; LIU, M.; CHE, J. *et al.* Inhibiting ferroptosis: A novel approach for stroke therapeutics. **Drug Discovery Today**, 2021/01/04/ 2021.

JUNG, Y. S.; PARK, J. H.; KIM, H.; KIM, S. Y. *et al.* Probucol inhibits LPS-induced microglia activation and ameliorates brain ischemic injury in normal and hyperlipidemic mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, 37, n. 8, p. 1031-1044, 06/27 10/20/received 03/21/accepted 2016.

KAJI, R. Global burden of neurological diseases highlights stroke. **Nature Reviews Neurology**, 15, n. 7, p. 371-372, 2019/07/01 2019.

KARTHIKEYAN, S.; JEFFERS, M. S.; CARTER, A.; CORBETT, D. Characterizing Spontaneous Motor Recovery Following Cortical and Subcortical Stroke in the Rat. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, 33, n. 1, p. 27-37, 2019.

KAWABATA, H. Transferrin and transferrin receptors update. **Free Radical Biology and Medicine**, 133, p. 46-54, 2019/03/01/ 2019.

KHATRI, R.; MCKINNEY, A. M.; SWENSON, B.; JANARDHAN, V. Blood–brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. **Neurology**, 79, n. 13 Supplement 1, p. S52, 2012.

KILKENNY, C.; BROWNE, W. J.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M. *et al.* Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLOS Biology**, 8, n. 6, p. e1000412, 2010.

KIM, J.-T.; FONAROW, G. C.; SMITH, E. E.; REEVES, M. J. *et al.* Treatment With Tissue Plasminogen Activator in the Golden Hour and the Shape of the 4.5-Hour Time-Benefit Curve in the National United States Get With The Guidelines–Stroke Population. **Circulation**, 135, n. 2, p. 128-139, 2017.

KIM, S. C.; LEE, J. R.; PARK, S. J. Role of 6-Shogaol in *Tert*-Butyl Hydroperoxide-Induced Apoptosis of HepG2 Cells. **Pharmacology**, 93, n. 3-4, p. 137-144, 2014.

KNUTSON, M. D. Steap proteins: implications for iron and copper metabolism. **Nutr Rev**, 65, n. 7, p. 335-340, Jul 2007.

KUČERA, O.; ENDLICHER, R.; ROUŠAR, T.; LOTKOVÁ, H. *et al.* The Effect of *tert*-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes *In Vitro*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014, p. 752506, 2014/03/31 2014.

LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, 115, p. 157-188, 2014/04/01/ 2014.

LALANCETTE-HÉBERT, M.; GOWING, G.; SIMARD, A.; WENG, Y. C. *et al.* Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 27, n. 10, p. 2596-2605, 2007.

- LANE, D. J. R.; BAE, D.-H.; MERLOT, A. M.; SAHNI, S. *et al.* Duodenal cytochrome b (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. **Nutrients**, 7, n. 4, p. 2274-2296, 2015.
- LEWERENZ, J.; MAHER, P.; METHNER, A. Regulation of xCT expression and system x (c) (-) function in neuronal cells. **Amino Acids**, 42, n. 1, p. 171-179, Jan 2012.
- LI, Y.; CHEN, J.; WANG, L.; LU, M. *et al.* Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. **Neurology**, 56, n. 12, p. 1666-1672, Jun 26 2001.
- LI, Y.; MAHER, P.; SCHUBERT, D. A Role for 12-lipoxygenase in Nerve Cell Death Caused by Glutathione Depletion. **Neuron**, 19, n. 2, p. 453-463, 1997.
- LIAO, L.; JIANG, C.; CHEN, J.; SHI, J. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 1,2,4-triazole derivatives as potential neuroprotectant against ischemic brain injury. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 190, p. 112114, 2020/03/15/ 2020.
- LIU, Y.; FANG, Y.; ZHANG, Z.; LUO, Y. *et al.* Ferroptosis: An emerging therapeutic target in stroke. **Journal of Neurochemistry**, 160, n. 1, p. 64-73, 2022.
- LIVELY, S.; SCHLICHTER, L. C. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 12, 2018-July-24 2018. Original Research.
- LIVNE-BAR, I.; LAM, S.; CHAN, D.; GUO, X. *et al.* Pharmacologic inhibition of reactive gliosis blocks TNF- α -mediated neuronal apoptosis. **Cell Death & Disease**, 7, n. 9, p. e2386-e2386, 2016/09/01 2016.
- LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature Reviews Neuroscience**, 4, n. 5, p. 399-414, 2003/05/01 2003.
- LOMBARDI, G.; VARSALDI, F.; MIGLIO, G.; PAPINI, M. G. *et al.* Cabergoline prevents necrotic neuronal death in an in vitro model of oxidative stress. **European Journal of Pharmacology**, 457, n. 2, p. 95-98, 2002/12/20/ 2002.
- LV, H.; SHANG, P. The significance, trafficking and determination of labile iron in cytosol, mitochondria and lysosomes. **Metallomics**, 10, n. 7, p. 899-916, Jul 18 2018.
- MACRAE, I. M.; ROBINSON, M. J.; GRAHAM, D. I.; REID, J. L. *et al.* Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. **J Cereb Blood Flow Metab**, 13, n. 2, p. 276-284, Mar 1993.
- MAHER, P.; CURRAIS, A.; SCHUBERT, D. Using the Oxytosis/Ferroptosis Pathway to Understand and Treat Age-Associated Neurodegenerative Diseases. **Cell Chemical Biology**, 27, n. 12, p. 1456-1471, 2020.

- MAO, L.; ZUO, M.-L.; WANG, A.-P.; TIAN, Y. *et al.* Low expression of miR-532-3p contributes to cerebral ischemia/reperfusion oxidative stress injury by directly targeting NOX2. **Molecular medicine reports**, 22, n. 3, p. 2415-2423, 2020.
- MCCOLL, B. W.; CARSWELL, H. V.; MCCULLOCH, J.; HORSBURGH, K. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. **Brain Res**, 997, n. 1, p. 15-23, Jan 30 2004.
- MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R. *et al.* Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **European Journal of Pharmacology**, 698, n. 1, p. 6-18, 2013/01/05/ 2013.
- MILLÁN, M.; SOBRINO, T.; ARENILLAS, J. F.; RODRÍGUEZ-YÁÑEZ, M. *et al.* Biological signatures of brain damage associated with high serum ferritin levels in patients with acute ischemic stroke and thrombolytic treatment. **Dis Markers**, 25, n. 3, p. 181-188, 2008.
- MILLAN, M.; SOBRINO, T.; CASTELLANOS, M.; NOMBELA, F. *et al.* Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke. **Stroke**, 38, n. 1, p. 90-95, Jan 2007.
- MOHSIN ALVI, A.; TARIQ AL KURY, L.; UMAR IJAZ, M.; ALI SHAH, F. *et al.* Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1,3,4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration. **Biomolecules**, 10, n. 6, p. 816, 2020.
- MORIZAWA, Y. M.; HIRAYAMA, Y.; OHNO, N.; SHIBATA, S. *et al.* Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. **Nature Communications**, 8, n. 1, p. 28, 2017/06/22 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, n. 1, p. 55-63, 1983/12/16/ 1983.
- MOUJALLED, D.; STRASSER, A.; LIDDELL, J. R. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. **Cell Death & Differentiation**, 28, n. 7, p. 2029-2044, 2021/07/01 2021.
- MOUSTAFA, R. R.; BARON, J.-C. Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, 153, n. S1, p. S44-S54, 2008.
- MUTHAIAH, V. P. K.; MICHAEL, F. M.; PALANIAPPAN, T.; RAJAN, S. S. *et al.* JNK1 and JNK3 play a significant role in both neuronal apoptosis and necrosis. Evaluation based on in vitro approach using tert-butylhydroperoxide induced oxidative stress in neuro-2A cells and perturbation through 3-aminobenzamide. **Toxicology in Vitro**, 41, p. 168-178, 2017/06/01/ 2017.

NAGHAVI, M.; ABAJOBIR, A. A.; ABBAFATI, C.; ABBAS, K. M. *et al.* Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, 390, n. 10100, p. 1151-1210, 2017.

NAIME, A. A.; BARBOSA, F. A. R.; BUENO, D. C.; CURI PEDROSA, R. *et al.* Prevention of ferroptosis in acute scenarios: an in vitro study with classic and novel anti-ferroptotic compounds. **Free Radical Research**, 55, n. 11-12, p. 1062-1079, 2021/12/02 2021.

NEHER, J. J.; EMMRICH, J. V.; FRICKER, M.; MANDER, P. K. *et al.* Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110, n. 43, p. E4098-E4107, 2013.

NEUMANN, J.; SAUERZWEIG, S.; RÖNICKE, R.; GUNZER, F. *et al.* Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 28, n. 23, p. 5965-5975, 2008.

OLMEZ, I.; OZYURT, H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. **Neurochemistry International**, 60, n. 2, p. 208-212, 2012/01/01/ 2012.

PALMER, C.; ROBERTS, R. L.; BERO, C. Deferoxamine posttreatment reduces ischemic brain injury in neonatal rats. **Stroke**, 25, n. 5, p. 1039-1045, May 1994.

PATT, A.; HORESH, I. R.; BERGER, E. M.; HARKEN, A. H. *et al.* Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. **J Pediatr Surg**, 25, n. 2, p. 224-227; discussion 227-228, Feb 1990.

PEKCEC, A.; YIGITKANLI, K.; JUNG, J. E.; PALLAST, S. *et al.* Following experimental stroke, the recovering brain is vulnerable to lipoxigenase-dependent semaphorin signaling. **Faseb j**, 27, n. 2, p. 437-445, Feb 2013.

PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, 50, n. 4, p. 427-434, 2005.

PERCIE DU SERT, N.; ALFIERI, A.; ALLAN, S. M.; CARSWELL, H. V. O. *et al.* The IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments). **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 37, n. 11, p. 3488-3517, 2017/11/01 2017.

PIAS, E. K.; AW, T. Y. Early redox imbalance mediates hydroperoxide-induced apoptosis in mitotic competent undifferentiated PC-12 cells. **Cell Death & Differentiation**, 9, n. 9, p. 1007-1016, 2002/09/01 2002.

PICCARDI, B.; ARBA, F.; NESI, M.; PALUMBO, V. *et al.* Reperfusion Injury after ischemic Stroke Study (RISKS): single-centre (Florence, Italy), prospective observational protocol study. **BMJ Open**, 8, n. 5, p. e021183, May 24 2018.

PLOUGHMAN, M.; WINDLE, V.; MACLELLAN, C. L.; WHITE, N. *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor Contributes to Recovery of Skilled Reaching After Focal Ischemia in Rats. **Stroke**, 40, n. 4, p. 1490-1495, 2009.

POLAZZI, E.; ALTAMIRA, L. E. P.; ELEUTERI, S.; BARBARO, R. *et al.* Neuroprotection of microglial conditioned medium on 6-hydroxydopamine-induced neuronal death: role of transforming growth factor beta-2. **Journal of Neurochemistry**, 110, n. 2, p. 545-556, 2009.

POWERS, W. J. Acute Ischemic Stroke. **New England Journal of Medicine**, 383, n. 3, p. 252-260, 2020.

QIN, C.; ZHOU, L.-Q.; MA, X.-T.; HU, Z.-W. *et al.* Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. **Neuroscience bulletin**, 35, n. 5, p. 921-933, 2019.

QIN, Y.; SUN, X.; SHAO, X.; HU, M. X. *et al.* Lipopolysaccharide Preconditioning Induces an Anti-inflammatory Phenotype in BV2 Microglia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 36, n. 8, p. 1269-1277, 2016/11/01 2016.

QUISPE, R. L.; CANTO, R. F. S.; JARAMILLO, M. L.; BARBOSA, F. A. R. *et al.* Design, Synthesis, and In Vitro Evaluation of a Novel Probucol Derivative: Protective Activity in Neuronal Cells Through GPx Upregulation. **Molecular Neurobiology**, February 12 2018. journal article.

QUISPE, R. L.; JARAMILLO, M. L.; WOLIN, I. A. V.; CANTO, R. F. S. *et al.* A Novel Diselenide-Probucol-Analogue Protects Against Methylmercury-Induced Toxicity in HT22 Cells by Upregulating Peroxide Detoxification Systems: a Comparison with Diphenyl Diselenide. 40, n. 1, p. 127-139, Feb 2022.

RANSOHOFF, R. M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? **Nature Neuroscience**, 19, n. 8, p. 987-991, 2016/08/01 2016.

REICHERT, C. O.; DE FREITAS, F. A.; SAMPAIO-SILVA, J.; ROKITA-ROSA, L. *et al.* Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 22, p. 8765, 2020.

REWELL, S. S. J.; CHURILOV, L.; SIDON, T. K.; ALEKSOSKA, E. *et al.* Evolution of ischemic damage and behavioural deficit over 6 months after MCAo in the rat: Selecting the optimal outcomes and statistical power for multi-centre preclinical trials. **PloS one**, 12, n. 2, p. e0171688-e0171688, 2017.

RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, E. L. G.; SANTOS, D. B.; COLLE, D. *et al.* Probucol Affords Neuroprotection in a 6-OHDA Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, 38, n. 3, p. 660-668, 2013/03/01 2013.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc**, 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

RYAN, F.; ZARRUK, J. G.; LÖBLEIN, L.; DAVID, S. Ceruloplasmin Plays a Neuroprotective Role in Cerebral Ischemia. **Frontiers in neuroscience**, 12, p. 988-988, 2019.

SACCO, R. L.; KASNER, S. E.; BRODERICK, J. P.; CAPLAN, L. R. *et al.* An Updated Definition of Stroke for the 21st Century. **Stroke**, 44, n. 7, p. 2064-2089, 2013.

SANTOS, D. B.; COLLE, D.; MOREIRA, E. L. G.; HORT, M. A. *et al.* Succinobucol, a Non-Statins Hypocholesterolemic Drug, Prevents Premotor Symptoms and Nigrostriatal Neurodegeneration in an Experimental Model of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, 54, n. 2, p. 1513-1530, 2017/03/01 2017.

SANTOS, D. B.; PERES, K. C.; RIBEIRO, R. P.; COLLE, D. *et al.* Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Experimental Neurology**, 233, n. 2, p. 767-775, 2012/02/01/ 2012.

SAVAGE, J. C.; JAY, T.; GODUNI, E.; QUIGLEY, C. *et al.* Nuclear receptors license phagocytosis by trem2⁺ myeloid cells in mouse models of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 35, n. 16, p. 6532-6543, 2015.

SCHAAR, K. L.; BRENNEMAN, M. M.; SAVITZ, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. **Experimental & translational stroke medicine**, 2, n. 1, p. 13-13, 2010.

SCHIRRMACHER, R.; DEA, M.; HEISS, W. D.; KOSTIKOV, A. *et al.* Which Aspects of Stroke Do Animal Models Capture? A Multitracer Micro-PET Study of Focal Ischemia with Endothelin-1. **Cerebrovascular Diseases**, 41, n. 3-4, p. 139-147, 2016.

SCHMIDT, A.; HOPPEN, M.; STRECKER, J.-K.; DIEDERICH, K. *et al.* Photochemically induced ischemic stroke in rats. **Experimental & translational stroke medicine**, 4, n. 1, p. 13-13, 2012.

SHAH, R.; SHCHEPINOV, M. S.; PRATT, D. A. Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. **ACS Cent Sci**, 4, n. 3, p. 387-396, Mar 28 2018.

SHARKEY, J.; BUTCHER, S. P. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. **J Neurosci Methods**, 60, n. 1-2, p. 125-131, Aug 1995.

SHE, X.; LAN, B.; TIAN, H.; TANG, B. Cross Talk Between Ferroptosis and Cerebral Ischemia. **Frontiers in neuroscience**, 14, p. 776-776, 2020.

SHEN, X.-Y.; GAO, Z.-K.; HAN, Y.; YUAN, M. *et al.* Activation and Role of Astrocytes in Ischemic Stroke. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 15, 2021-November-17 2021. Review.

SHI, X.; LUO, L.; WANG, J.; SHEN, H. *et al.* Stroke subtype-dependent synapse elimination by reactive gliosis in mice. **Nature Communications**, 12, n. 1, p. 6943, 2021/11/26 2021.

SŁOMKA, A.; ŚWITOŃSKA, M.; ŻEKANOWSKA, E. Hepcidin Levels Are Increased in Patients with Acute Ischemic Stroke: Preliminary Report. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, 24, n. 7, p. 1570-1576, Jul 2015.

SOMMER, C. J. Ischemic stroke: experimental models and reality. **Acta neuropathologica**, 133, n. 2, p. 245-261, 2017.

SONG, G. J.; SUK, K. Pharmacological Modulation of Functional Phenotypes of Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in aging neuroscience**, 9, p. 139-139, 2017.

SOTOCINAL, S. G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A. H. *et al.* The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Mol Pain**, 7, p. 55, Jul 29 2011.

SOUZA, V. d. Efeito protetor de compostos inéditos derivados do probucol em células HT22 na toxicidade induzida glutamato. **Repositório Institucional da UFSC**, 2017.

SPRONK, E.; SYKES, G.; FALCIONE, S.; MUNSTERMAN, D. *et al.* Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke and the Role of Inflammation. **Frontiers in Neurology**, 12, 2021-May-14 2021. Review.

STOCKWELL, B. R.; FRIEDMANN ANGELI, J. P.; BAYIR, H.; BUSH, A. I. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, 171, n. 2, p. 273-285, 2017.

SZALAY, G.; MARTINECZ, B.; LÉNÁRT, N.; KÖRNYEI, Z. *et al.* Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. **Nature Communications**, 7, n. 1, p. 11499, 2016/05/03 2016.

SZEPESI, Z.; MANOUCHEHRIAN, O.; BACHILLER, S.; DEIERBORG, T. Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 12, n. 323, 2018-September-27 2018. Review.

TARDIF, J.-C.; GRÉGOIRE, J.; SCHWARTZ, L.; TITLE, L. *et al.* Effects of AGI-1067 and Probucol After Percutaneous Coronary Interventions. **Circulation**, 107, n. 4, p. 552-558, 2003.

TARDIF, J.-C.; MCMURRAY, J. J. V.; KLUG, E.; SMALL, R. *et al.* Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, 371, n. 9626, p. 1761-1768, 2008/05/24/ 2008.

THORED, P.; HELDMANN, U.; GOMES-LEAL, W.; GISLER, R. *et al.* Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**, 57, n. 8, p. 835-849, Jun 2009.

TOBABEN, S.; GROHM, J.; SEILER, A.; CONRAD, M. *et al.* Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. **Cell Death & Differentiation**, 18, n. 2, p. 282-292, 2011/02/01 2011.

TOWFIGHI, A.; OVBIAGELE, B.; HUSSEINI, N. E.; HACKETT, M. L. *et al.* Poststroke Depression: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, 48, n. 2, p. e30-e43, 2017.

TSAI, M.-H.; KUO, C.-W.; LIN, T.-K.; HO, C.-J. *et al.* Ischemic Stroke Risk Associated with Mitochondrial Haplogroup F in the Asian Population. **Cells**, 9, n. 8, p. 1885, 2020.

TUO, Q. z.; LEI, P.; JACKMAN, K. A.; LI, X. I. *et al.* Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. **Molecular Psychiatry**, 22, n. 11, p. 1520-1530, 2017/11/01 2017.

TYMIANSKI, M. Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. **Nature Neuroscience**, 14, n. 11, p. 1369-1373, 2011/11/01 2011.

VALDÉS HERNÁNDEZ, M. D. C.; CASE, T.; CHAPPELL, F. M.; GLATZ, A. *et al.* Association between Striatal Brain Iron Deposition, Microbleeds and Cognition 1 Year After a Minor Ischaemic Stroke. **Int J Mol Sci**, 20, n. 6, Mar 14 2019.

WANG, P.; CUI, Y.; REN, Q.; YAN, B. *et al.* Mitochondrial ferritin attenuates cerebral ischaemia/reperfusion injury by inhibiting ferroptosis. **Cell death & disease**, 12, n. 5, p. 447-447, 2021.

WANG, Q.; YAO, H.; LIU, W.; YA, B. *et al.* Microglia Polarization in Alzheimer's Disease: Mechanisms and a Potential Therapeutic Target. **Frontiers in aging neuroscience**, 13, p. 772717-772717, 2021.

WENZ, C.; FAUST, D.; LINZ, B.; TURMANN, C. *et al.* t-BuOOH induces ferroptosis in human and murine cell lines. **Archives of Toxicology**, 92, n. 2, p. 759-775, 2018/02/01 2018.

WINDLE, V.; SZYMANSKA, A.; GRANTER-BUTTON, S.; WHITE, C. *et al.* An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. **Experimental Neurology**, 201, n. 2, p. 324-334, 2006/10/01/ 2006.

WOODRUFF, T. M.; THUNDYIL, J.; TANG, S.-C.; SOBEY, C. G. *et al.* Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Molecular Neurodegeneration**, 6, n. 1, p. 11, 2011/01/25 2011.

WU, C.; ZHAO, W.; YU, J.; LI, S. *et al.* Induction of ferroptosis and mitochondrial dysfunction by oxidative stress in PC12 cells. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 574, 2018/01/12 2018.

XIAO, F.-J.; ZHANG, D.; WU, Y.; JIA, Q.-H. *et al.* miRNA-17-92 protects endothelial cells from erastin-induced ferroptosis through targeting the A20-ACSL4 axis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 515, n. 3, p. 448-454, 2019/07/30/ 2019.

XU, Y.-Y.; WAN, W.-P.; ZHAO, S.; MA, Z.-G. L-type Calcium Channels are Involved in Iron-induced Neurotoxicity in Primary Cultured Ventral Mesencephalon Neurons of Rats. **Neuroscience Bulletin**, 36, n. 2, p. 165-173, 2020/02/01 2020.

XU, Y.; LI, K.; ZHAO, Y.; ZHOU, L. *et al.* Role of Ferroptosis in Stroke. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2022/01/31 2022.

YAGHI, S.; WILLEY, J. Z.; CUCCHIARA, B.; GOLDSTEIN, J. N. *et al.* Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, 48, n. 12, p. e343-e361, 2017.

YAMASHITA, S.; MASUDA, D.; MATSUZAWA, Y. Did we abandon probucol too soon? **Curr Opin Lipidol**, 26, n. 4, p. 304-316, Aug 2015.

YAN, A.; LIU, Z.; SONG, L.; WANG, X. *et al.* Idebenone Alleviates Neuroinflammation and Modulates Microglial Polarization in LPS-Stimulated BV2 Cells and MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 12, 2019-January-09 2019. Original Research.

YAN, H.-f.; ZOU, T.; TUO, Q.-z.; XU, S. *et al.* Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 6, n. 1, p. 49, 2021/02/03 2021.

YANG, W. S.; STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. **Trends in Cell Biology**, 26, n. 3, p. 165-176, 2016.

YIGITKANLI, K.; PEKCEC, A.; KARATAS, H.; PALLAST, S. *et al.* Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. **Ann Neurol**, 73, n. 1, p. 129-135, Jan 2013.

YOO, S.-J.; CHO, B.; LEE, D.; SON, G. *et al.* The erythropoietin-derived peptide MK-X and erythropoietin have neuroprotective effects against ischemic brain damage. **Cell Death & Disease**, 8, n. 8, p. e3003-e3003, 2017/08/01 2017.

ZEIGER, S. L. H.; MUSIEK, E. S.; ZANONI, G.; VIDARI, G. *et al.* Neurotoxic lipid peroxidation species formed by ischemic stroke increase injury. **Free radical biology & medicine**, 47, n. 10, p. 1422-1431, 2009.

ZEPEDA, R.; CONTRERAS, V.; PISSANI, C.; STACK, K. *et al.* Venlafaxine treatment after endothelin-1-induced cortical stroke modulates growth factor expression and reduces tissue damage in rats. **Neuropharmacology**, 107, p. 131-145, 2016/08/01/ 2016.

ZHANG, S. R.; PHAN, T. G.; SOBEY, C. G. Targeting the Immune System for Ischemic Stroke. **Trends Pharmacol Sci**, 42, n. 2, p. 96-105, Feb 2021.

ZHANG, X.; SHEN, X.; DONG, J.; LIU, W.-C. *et al.* Inhibition of Reactive Astrocytes with Fluorocitrate Ameliorates Learning and Memory Impairment Through Upregulating CRTCL1 and Synaptophysin in Ischemic Stroke Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 39, n. 8, p. 1151-1163, 2019/11/01 2019.

ZHAO, K.; LUO, G.; GIANNELLI, S.; SZETO, H. H. Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. **Biochemical Pharmacology**, 70, n. 12, p. 1796-1806, 2005/12/05/ 2005.

ZHAO, W.; FENG, H.; SUN, W.; LIU, K. *et al.* Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: Roles of NOX4 and mitochondrion. **Redox biology**, 11, p. 524-534, 2017.

ZHOU, X.; SPITTAU, B. Lipopolysaccharide-Induced Microglia Activation Promotes the Survival of Midbrain Dopaminergic Neurons In Vitro. **Neurotoxicity Research**, 33, n. 4, p. 856-867, 2018/05/01 2018.

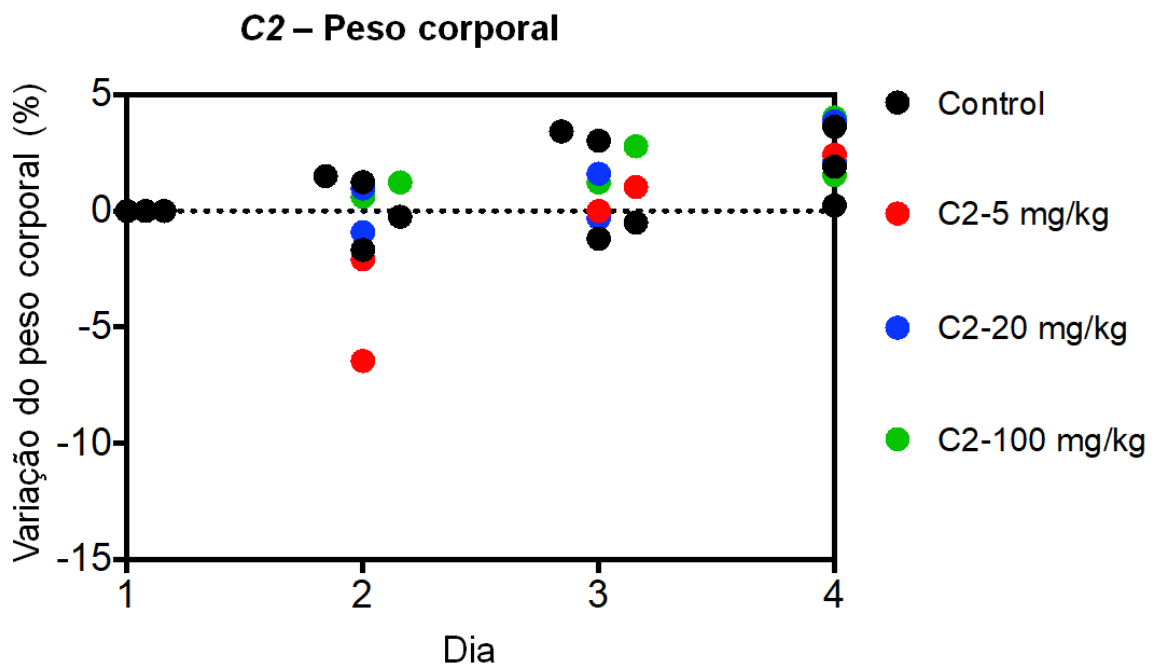
APÊNDICE A – Material suplementar

Tabela Suplementar 1: químicos, reagentes e anticorpos usados nos estudos.

Chemicals/reagents	Supplier	Code
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Thermo Fisher	15240062
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	472301; D2650
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Thermo Fisher	12100046
Endothelin-1	Sigma-Aldrich	E7764
Fetal bovine serum (FBS)	Thermo Fisher	16140071
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich	H8264
L-Glutamic acid	Sigma-Aldrich	G1251
Lipopolysaccharides from Escherichia coli O111:B4	Sigma-Aldrich	L2630
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride	Sigma-Aldrich	222488
Propidium iodide (PI)	Sigma-Aldrich	P4170
Sulfanilamide	Sigma-Aldrich	S9251
<i>tert-Butyl hydroperoxide</i> (t-BuOOH)	Sigma-Aldrich	458139
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher	15400054
Antibodies/reagents	Supplier	Code
Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) rabbit polyclonal	Sigma-Aldrich	G9269
Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Peroxidase Conjugated	Sigma-Aldrich	AP132P

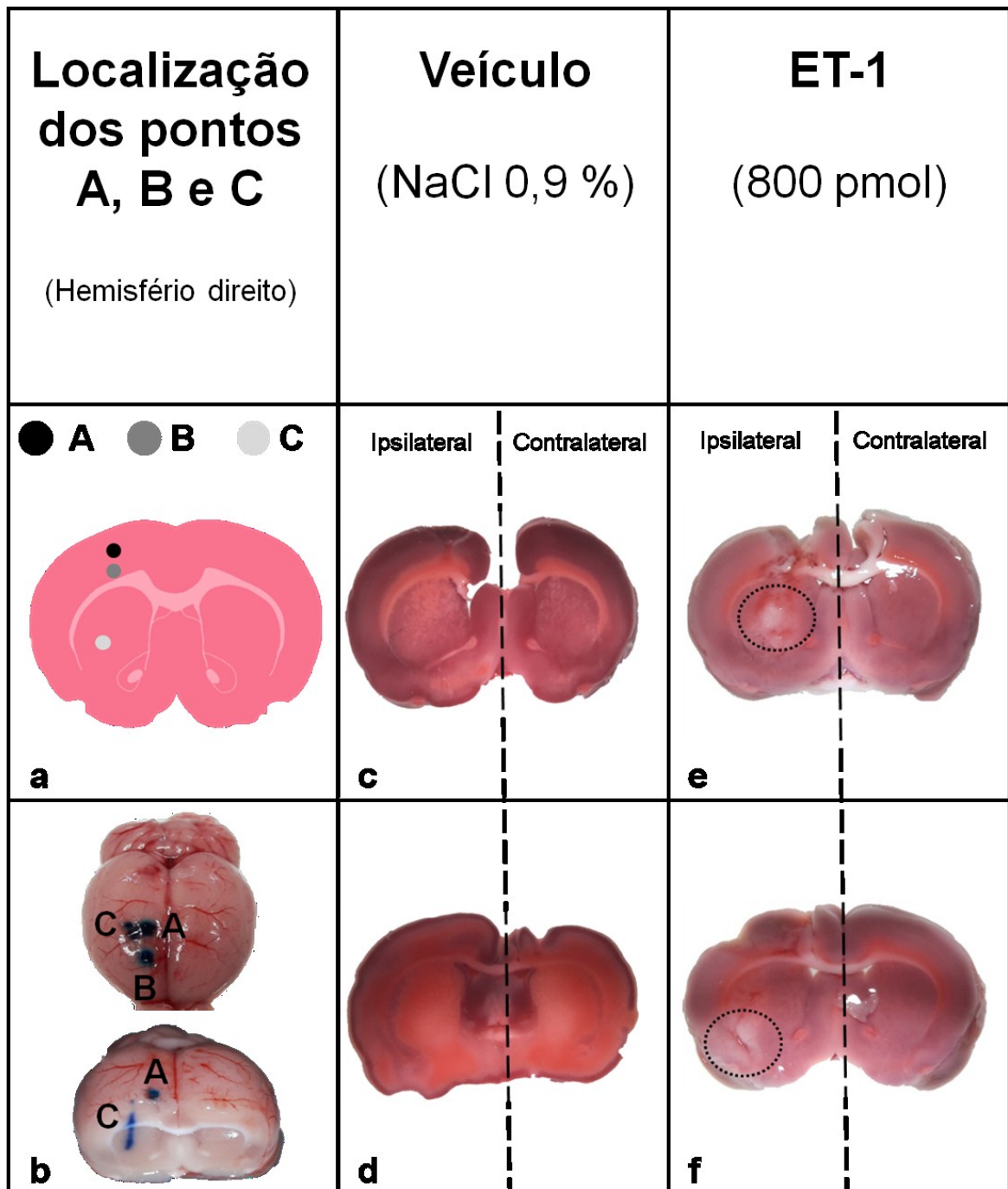
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride	Sigma-Aldrich	D5905
--	---------------	-------

Figura Suplementar 1 – Avaliação toxicológica preliminar.



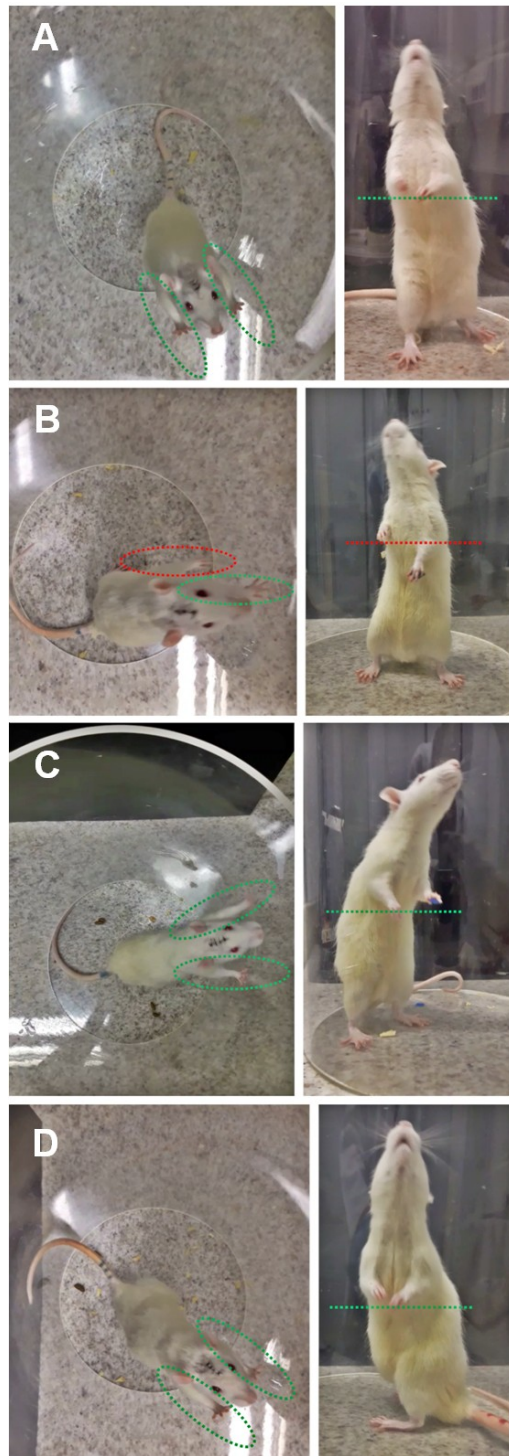
A toxicidade foi avaliada com base na taxa de mortalidade e na perda de peso corporal. Os animais receberam injeções intraperitoneais do **C2** uma vez por dia durante quatro dias. O gráfico retrata o peso corporal dos animais durante o estudo toxicológico. O número experimental por grupo foi 2 ($n = 2$), exceto para o grupo controle ($n = 4$). Cada círculo representa um indivíduo. Não foram observadas alterações macroscópicas e efeitos tóxicos gerais em animais tratados com **C2**.

Figura Suplementar 2 – Locais das injeções estereotáxicas e dano tecidual induzido por ET-1.



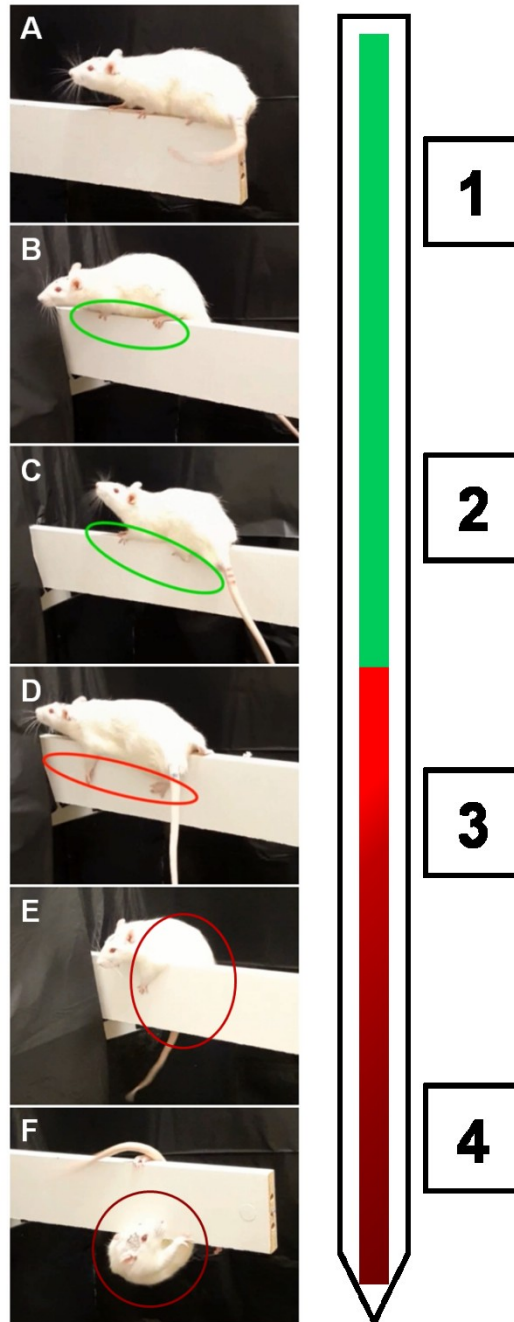
Representação esquemática dos locais de injeção da ET-1 (a). Imagem representativa de um cérebro de rato mostrando as localizações reais das injeções de ET-1 (b) (azul de metileno foi usado como corante). A coloração TTC (cloreto de trifetil tetrazólio) foi usada para avaliar as lesões (círculo pontilhado). Fatias representativas do cérebro de dois animais do grupo controle (c e d). Fatias representativas do cérebro de dois animais tratados com ET-1 (e e f).

Figura Suplementar 3 – Padrões comportamentais no teste do cilindro.



A figura mostra imagens representativas dos perfis comportamentais encontrados no teste do cilindro. Contatos bilaterais frequentes e elevação simultânea de ambos os membros anteriores durante a exploração vertical foram registrados principalmente nos animais do grupo controle (A) e tratados com ET-1 + C2, nas concentrações de 20 e 50 mg/kg (C e D). Ratos tratados apenas com ET-1 (B) fizeram principalmente contatos ipsilaterais com a parede do cilindro e (na maioria) não elevaram seus membros anteriores simultaneamente. Os dados quantitativos foram representados na Figura 12.

Figura Suplementar 4 – Padrões comportamentais no teste de equilíbrio em feixe.



Imagens representativas dos escores utilizados para quantificar o equilíbrio dos animais. (1) O animal apresentou ótimo desempenho e equilíbrio estável nas tentativas de escalar a barreira. Não foi observado equilíbrio instável.

(2) O animal apresentou desempenho normal, com movimentos trêmulos e equilíbrio predominantemente estável. (3) O animal apresentou desempenho anormal com equilíbrio instável. O animal tentou se equilibrar agarrando o feixe, mas escorregou, ficando temporariamente suspenso no feixe. Observou-se dificuldade em manter os membros contralaterais no feixe. (4) O animal apresentou desempenho severamente prejudicado e quedas após 10 s. (5) O animal é incapaz de manter o equilíbrio e cai antes de 10 s.

Detalhes do cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base em um conjunto experimental primário (pequeno) de animais, cujos resultados foram posteriormente adicionados ao estudo principal (composto por 4 conjuntos experimentais; detalhado na Tabela Suplementar 2).

Tabela Suplementar 2 – Número de sujeitos e conjuntos experimentais.

Conjuntos de animais	Número de sujeitos (antes da cirurgia)	Taxa de sobrevivência (%)	Número de sujeitos (depois da cirurgia)
<i>1º</i>	<i>17</i>	<i>82,35</i>	<i>14</i>
<i>2º</i>	17	76,47	13
<i>3º</i>	17	82,35	14
<i>4º</i>	20	80	16
Total	71	~ 80	57

Um total de 71 ratos foi utilizado no protocolo de isquemia focal. Devido a uma taxa de mortalidade de ~20%, 57 animais foram avaliados nas análises comportamentais e histológicas. O primeiro conjunto envolveu 14 animais que sobreviveram ao pós-operatório; esses animais foram usados para realizar cálculos de tamanho de amostra.

Para o cálculo do tamanho da amostra, inicialmente avaliamos o desempenho dos animais (n = 14) no teste do cilindro, que tem sido relatado como uma ferramenta valiosa para avaliar o dano unilateral central (SCHAAR; BRENNEMAN; SAVITZ, 2010). O número de animais por grupo no primeiro conjunto experimental, bem como os dados brutos (média e desvio padrão), são descritos na Figura Suplementar 5 (abaixo).

Figura Suplementar 5 – Dados brutos do teste do cilindro do primeiro conjunto experimental de animais.

Table format: Grouped		Group A			Group B		
		Saline (0.9%)			ET-1 (800 pmol)		
		A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3
1	Vehicle	40.00	51.51	48.48	16.66	34.61	
2	20	33.33			44.44	44.06	39.32
3	50	47.72	42.10	54.54	26.66	45.16	
4	Title						

Row Stats		A			B		
		Saline (0.9%)			ET-1 (800 pmol)		
		Mean	SD	N	Mean	SD	N
1	Vehicle	46.663	5.966	3	25.635	12.693	2
2	20	33.330	0.000	1	42.607	2.853	3
3	50	48.120	6.230	3	35.910	13.081	2
4							

Folha superior: dados brutos e distribuição dos animais por grupo. Folha inferior: Médias, desvio padrão (DP) e número experimental (N). ET-1 = Endotelina-1; 20 e 50 = doses de C2 (20 e 50 mg/kg, respectivamente).

Com base nesses dados, o cálculo do tamanho da amostra foi realizado por meio do software Statistica, versão 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA, 2008), detalhado na Figura Suplementar 6 (abaixo).

Figura Suplementar 6 – Dados usados para cálculo do tamanho da amostra.

The figure shows two screenshots of the Statistica software interface. The left screenshot is titled "2-Way ANOVA Effects Calculation" and displays various statistical measures and population means. The right screenshot is titled "2-Way ANOVA: Sample Size" and displays fixed parameters for Alpha, No. of Rows, No. of Cols., and Power Goal.

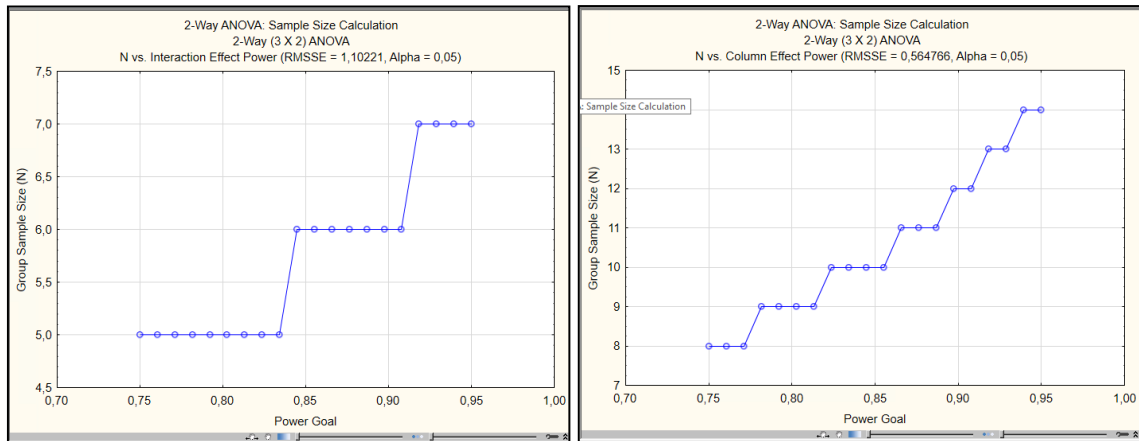
Row	Column 1	Column 2
1	46.663	25.635
2	33.33	42.607
3	48.12	35.91

Os dados utilizados foram derivados das médias presentes na Figura Suplementar 5. O valor de SD (Sigma = 10) foi escolhido com base na média dos valores de SDs. Col. Medidas de Efeito refere-se ao tratamento com ET-1; Medidas de efeito de linha refere-se ao tratamento RC 513; Int. Medidas de Efeito refere-se à interação de ambos os tratamentos (ET-1 e RC 513); RMSSE = Efeito Padronizado da Raiz Média Quadrada.

Considerando um poder de meta = 0,8 e $\alpha = 0,05$, o cálculo do tamanho da amostra indicou a necessidade de (i) um número experimental mínimo de 9 animais por grupo para

efeito ET-1 e (ii) um número experimental mínimo de 5 animais por grupo para o efeito de interação, detalhado na Figura Suplementar 7 (abaixo).

Figura suplementar 7 – Cálculo do tamanho da amostra.



O tamanho da amostra do grupo (eixo Y) é plotado em relação à potência desejada (eixo X). O gráfico da direita indica um número experimental mínimo de 9 animais por grupo para efeito de ET-1. O gráfico da esquerda indica um número experimental mínimo de 5 animais por grupo para efeitos de interação.

Foi selecionado o número experimental de 9 animais por grupo; no entanto, considerando possíveis perdas de animais durante a cirurgia e/ou tratamentos nos 3 conjuntos experimentais adicionais seguintes, inicialmente decidimos aumentar esse número para até 11. De fato, tivemos uma mortalidade significativa (~20%) no período cirúrgico e/ou período pós-cirúrgico (detalhados abaixo). Considerando tais perdas e o fato de que os grupos mais relevantes [(i) controle; (ii) ET-1 e (iii) ET-1 + RC 50 mg/kg C2] foram priorizados ao alocar animais nos três últimos conjuntos experimentais, seu número experimental foi mantido em onze (N = 11), detalhado no Tabela Suplementar 3 (abaixo).

Tabela Suplementar 3 – Número experimental por grupo no final do estudo.

Conjunto experimental →	Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto	TOTAL
Grupos ↓					
Controle	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (3)	12 (11)
ET-1	3 (2)	4 (3)	4 (3)	3 (3)	14 (11)
C2 (20)	2 (1)	2 (1)	2 (2)	4 (2)	10 (6)
C2 (50)	3 (3)	2 (1)	2 (2)	3 (2)	10 (8)
ET-1 + C2 (20)	3 (3)	3 (3)	2 (1)	4 (3)	12 (10)
ET-1 + C2 (50)	3 (2)	3 (3)	4 (3)	3 (3)	13 (11)
TOTAL	17 (14)	17 (13)	17 (14)	20 (16)	71 (57)

Embora tenhamos iniciado com 71 animais para o protocolo de isquemia focal, 57 animais foram avaliados nas análises comportamentais e histológicas devido a uma taxa de mortalidade de aproximadamente 20%. Os números entre parênteses indicam o número experimental real após as perdas dos animais.

Vídeos suplementares

https://drive.google.com/drive/folders/1raOmrO7I3V1_OCSMTisyFsJm479xFmSM?usp=sharing.

Vídeo 1: Uso espontâneo do membro anterior no teste do cilindro. O vídeo mostra o uso espontâneo dos membros anteriores e a frequência de contatos com a parede do cilindro por meio de gravações representativas. Os contatos ipsilaterais excessivos foram destacados em vermelho, enquanto os contatos contralaterais foram mostrados em verde.

Vídeo 2: Variações de equilíbrio e postura durante o teste de equilíbrio em feixe. O vídeo exemplifica os diferentes comportamentos dos animais durante o teste. Uma elipse vermelha destaca a má postura com uso inadequado dos membros contralaterais para o

equilíbrio. A elipse verde mostra uma recuperação no uso dos membros contralaterais para o equilíbrio.

Vídeo 3: Diferenças sensório-motoras no teste da remoção do adesivo. Representativamente, o vídeo mostra os diferentes tempos que cada animal precisou para retirar o adesivo do membro contralateral anterior.

APÊNDICE B – Manuscrito 1**A novel probucol analogue prevents glutamate-induced ferroptosis *in vitro* and confers neuroprotection in a rodent model of ischemic stroke**

Mauricio Tavares Jacques^{1*}, Viviane de Souza¹, Flávio Augusto Rocha Barbosa², Rômulo Faria Santos Canto³, Samantha Cristiane Lopes⁴, Rui Daniel Prediger⁴, Antônio Luiz Braga², Michael Aschner⁵, Marcelo Farina^{1*}

¹ Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

² Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

³ Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

⁵ Department of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA.

* Correspondence: marcelo.farina@ufsc.br and mtjacques9@gmail.com

Federal University of Santa Catarina

Department of Biochemistry

Florianópolis, SC, Brazil

ZIP code: 88037-900

Tel: + 55 48 3721 4580

ABSTRACT

Ischemic stroke represents a major health problem requiring improved neuropharmacological treatments. In addition to energetic failure and excitotoxicity, injurious mechanisms associated with ischemic stroke involve oxidative glutamate dyshomeostasis and ferroptosis. We designed and synthesized two new probucol analogues [2,6-di-tert-Butyl-4-selenocyanatophenol (**C1**) and 4,4'-Diselanediybis (2,6-di-tert-butylphenol) (**C2**)] and investigated their effects against glutamate-induced neuronal ferroptosis *in vitro*, comparing with probucol. Moreover, a rodent model of ischemic stroke was used to investigate neuroprotective effects *in vivo*. Cultured neuronal HT22 cells, which do not express NMDA-type glutamate-receptors, were exposed to high glutamate concentrations, a classic model of ferroptosis. In *in vivo* studies, adult Wistar rats were subjected to experimental ischemic stroke through central injections of endothelin-1 (800 pmol/site). A subset of ischemic animals was treated with **C2** (20 or 50 mg/kg/day, i.p.) for 4 consecutive days after stroke to investigate neuroprotection. On the following day, motor-related behavioral skills and striatal reactive gliosis were evaluated. Glutamate caused concentration- and time-dependent cytotoxicity *in vitro*, which was preceded by increased levels of oxidants and glutathione depletion. The analogues, but not probucol, significantly decreased the levels of oxidants and protected against glutamate-induced cytotoxicity. **C2**, which was selected based on high antiferroptotic effects *in vitro* and low toxicity *in vivo*, protected against endothelin-1-induced ischemic injury *in vivo*, improving rats' behavioral skills and decreasing striatal gliosis. This is the first evidence that an antiferroptotic probucol analogue exhibits protective effects under *in vivo* conditions. These findings highlight the therapeutic potential of this new probucol analogue in ischemic stroke and/or further ferroptosis-related disorders.

1. INTRODUCTION

Stroke, which is characterized by the interruption of blood flow into specific region(s) of the brain, represents a major health concern. It is the second major cause of death (Collaborators et al., 2018; Kaji, 2019) and the leading cause of disability worldwide (Ferro et al., 2016; Towfighi et al., 2017). Ischemic stroke, which is characterized by the occlusion of blood vessels and commonly leads to focal tissue infarctions, is the most common type of stroke, representing approximately 70% of all reported cases (Collaborators et al., 2018). The main pharmacological strategy for treating acute stroke is based on reperfusion therapy with intravenous thrombolytic agents, such as alteplase (Powers, 2020). Although alteplase therapy is considered a thrombolytic standard treatment, most patients are not eligible for its use, since positive results are observed only in a short therapeutic window and are contrasted by the risks of hemorrhagic complications (Campbell et al., 2019; Yaghi et al., 2017).

The cell energetic crisis induced by focal cerebral hypoperfusion is the first step in a series of neurochemical events that develop subordinate to time and is known as ischemic cascade (Iadecola & Anrather, 2011). As ischemic events compromise the delivery of oxygen and glucose to cells, brain tissue is particularly vulnerable to ischemic stroke due to its high demand for both molecules during aerobic metabolism. Consequently, the damage of an infarcted brain region is directly correlated to the extent and duration of blood restriction (Brouns & De Deyn, 2009). In regions with severe blood restriction, the damage quickly becomes irreversible, creating a zone beyond therapeutic rescue called the ischemic core (Moustafa & Baron, 2008). Between the ischemic core and normal (not affected) brain tissue, there is the ischemic penumbra, an area less severely affected and therefore potentially salvageable, but which is progressively damaged by the insults resulting from ischemic cascade (Brouns & De Deyn, 2009). During a ischemic stroke, the consequent anoxic depolarization of neurons leads to the release of the excitatory neurotransmitter glutamate (Tymianski, 2011). The extracellular accumulation of glutamate leads to a hyperactivation of ionotropic NMDA-type glutamate receptors, which results in an aberrant neuronal calcium influx (Yoo et al., 2017). The deregulation of Ca^{2+} homeostasis triggers nuclear and cytoplasmic events that culminate in the production of free radicals, oxidative stress and cell death (Brouns & De Deyn, 2009; Yoo et al., 2017). In addition to such excitotoxic events, it is noteworthy that excess glutamate can also inhibit the cystine/glutamate antiporter system Xc-, causing ferroptosis, an iron-catalyzed type of regulated cell death driven by the oxidation of

membrane phospholipids (Dixon et al., 2012). Of particular importance, recent experiments have successfully intervened in the process of stroke in animal models by regulating ferroptosis, indicating that this recently described type of regulated cell death represents a potential target for the treatment of stroke (Xu et al., 2022).

Probucol is a hypocholesterolemic drug with a long history in the prevention and treatment of cardiovascular diseases (Yamashita et al., 2015). Besides its hypocholesterolemic action, recent studies based on oxidative models of neuropathology have indicated that probucol also displays neuroprotective effects (Colle et al., 2012; Colle et al., 2013; Ribeiro et al., 2013; Santos et al., 2012). On the other hand, because of significant adverse effects induced by probucol in humans (Jung et al., 2016; Tardif et al., 2003), scientific efforts have focused on the design and synthesis of probucol analogues (i.e., succinobucol) that can potentially share the positive efficacious effects of the parent compound, but with reduced or absent adverse effects (Colle et al., 2016; Santos et al., 2017; Tardif et al., 2003). Notably, recent evidences have shown that some probucol analogues are able to mitigate oxidative events underpinning ferroptosis under *in vitro* conditions (Bueno et al., 2020; Naime et al., 2021), despite the absence of *in vivo* findings.

Considering that (i) ferroptosis is a potential target for the treatment of stroke (Xu et al., 2022), (ii) the penumbra zone represents a therapeutic opportunity to mitigate stroke-mediated neuronal injury and (iii) probucol and analogues exhibit neuroprotective effects by mitigating molecular events underpinning ferroptosis (Bueno et al., 2020; Naime et al., 2021), this study aimed to investigate and compare the potential protective effects of probucol and two newly synthesized analogues [2,6-di-tert-Butyl-4-selenocyanatophenol (*Compound 1*; **C1**) and 4,4'-Diselanediylylbis (2,6-di-tert-butylphenol) (*Compound 2*, **C2**)] against ferroptosis induced by high concentrations of glutamate in HT22 cells, an established NMDA receptor-independent model of neuronal cytotoxicity (Selvaraj et al., 2020; Tobaben et al., 2011). We show that although probucol displayed no beneficial effects, both analogues significantly protected against glutamate-induced cytotoxicity. The most promising and with no apparent toxic effects compound (**C2**) was further investigated in an *in vivo* model of focal ischemic stroke in rats, based on the central injection of the potent vasoconstrictor endothelin-1 (Windle et al., 2006). We show that **C2** displayed significant protective effects against ET-1-induced ischemic injury *in vivo*, leading to a substantial improvement of rats' performance in behavioral tests, as well as a significant decrease in ET-induced striatal gliosis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. CHEMICALS/REAGENTS

Information concerning the chemicals used in this work is present in Supplemental Table 1, which depicts suppliers and product codes.

2.2. CHEMISTRY

2.2.1. Synthesis of probucol analogues

Records of NMR spectra (^1H NMR and ^{13}C NMR) were performed using a Bruker Avance 200 spectrometer. Chemical shifts (δ) were presented in ppm relative to TMS (^1H NMR) and solvent (^{13}C NMR). APPI and APCI-microTOF-Q II measurements were performed with a microTOF Q-II mass spectrometer (Bruker Daltonics) equipped with an automatic syringe pump (KD Scientific) for sample injection. Using the positive ion operation mode, samples were injected at a constant rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A chloroform/methanol mixture was used as solvent. The APPI or APCI-microTOF-Q II instrument was calibrated in the mass range 50–3000 m/z using an internal calibration standard (low-concentration tuning mix solution - Agilent Technologies). Data processing was performed using Bruker Compass Data Analysis software (version 4.0). Column chromatography and thin layer chromatography (TLC) were performed on Merck Silica Gel (230-400 mesh) and Merck Silica Gel GF254 (0.25 mm thickness), respectively. Exposure to ultraviolet light or staining with iodine vapor or acid vanillin was performed to visualize TLC plates.

2.2.2. Synthesis of 2,6-di-*tert*-butyl-4-selenocyanatophenol (*Compound 1*, *CI*)

CI was synthesized from 2,6-di-*tert*-butylphenol (Supplemental Fig. 1). Briefly, a mixture of malononitrile (5 mmol) and SeO_2 (10 mmol) in DMSO (6 mL) was prepared. After stirring for 20 min at room temperature, 2,6-di-*tert*-butylphenol (5 mmol) was added. After 30 min, the reaction media was diluted with ethyl acetate (AcOEt) and the extraction was performed with water and brine. The obtained organic phase was dried with MgSO_4 , for later

filtration and evaporation. Subsequently, the product obtained was purified by column chromatography using hexane as eluent.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) 1.43 (s, 18H), 5.52 (s, 1H), 7.46 (s, 2H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) 29.99, 34.56, 102.59, 110.59, 131.60, 138.38, 155.81. HRMS (APCI-TOF) calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NOSe}$ (M^+) 311.0783, found 311.0785.

2.2.3. Synthesis of 4,4'-diselanediybis(2,6-di-*tert*-butylphenol) (Compound 2, C2)

C2 was synthesized from **C1** (2,6-di-*tert*-Butyl-4-selenocyanatophenol) (Supplemental Fig. 1). Briefly, **C1** (0.32 mmol) was diluted in THF (3 mL) at room temperature; thereafter, NaBH_4 (0.32 mmol) was added. After 10 min of stirring at room temperature, 3 ml of NH_4Cl (saturated solution) was added. After an additional 10 min of stirring, the reaction medium was diluted with AcOEt and the extraction was performed with water and brine. The obtained organic phase was dried with MgSO_4 , for later filtration and evaporation.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) 1.39 (s, 18H), 5.26 (s, 1H), 7.43 (s, 2H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) 30.30, 34.57, 121.39, 130.21, 136.85, 154.37. HRMS (APCI, TOF) calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{Se}_2$ 570.1515 (M^+), found 570.1511.

2.3. *IN VITRO* STUDY WITH CULTURED CELLS

The neuronal HT22 cell line was kindly provided by Dr. David Schubert (Salk Institute, La Jolla, CA, USA). Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and glutamine (2 mM) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Cells were grown until they are 80–90% confluent and used between the 3rd and 12th passages. To investigate the potential protective effects of probucol analogues, cell cultures were pre-treated with 0.5 μM probucol, **C1** or **C2** and, following 24 h, challenged with 3 mM glutamate or 50 μM *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH).

2.3.1. Cell metabolic viability assay

In order to evaluate metabolic cellular viability, the cells ability to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) was quantified as previously described (Mosmann, 1983). Cells were seeded into 96-well plates at a density of 9.0×10^3 cells/cm³ for 24 h. Then, cells were incubated with 0.05% ethanol (EtOH, used as a vehicle), 0.5 μ M probucol, **C1** or **C2**. After 24 h, the medium was replaced by fresh DMEM supplemented with 3% FBS and cells were exposed to glutamate (0-10 mM) or 50 μ M *t*-BuOOH. Metabolic cell viability was evaluated at 1, 3, 6 or 24 h time intervals with a spectrophotometer (Infinite M200 TECAN Multileiter). Results were expressed as a percentage of the control (not treated) cells.

2.3.2. Cell death assay

Cell death assay was performed based on the incorporation and binding of propidium iodide (PI) to the DNA, producing red fluorescence in cells with damaged plasma membranes (Riccardi & Nicoletti, 2006). This analysis was complementary to the metabolic cell viability assay and its experimental protocol (seeding and treatments) was the same as in item 2.3.1. Subsequently, cells were incubated with PI (147 μ g/mL) for 30 min. After incubation, the fluorescence was measured with excitation at 525 nm and emission at 617 nm. Data were expressed as percentage of fluorescence relative to cells treated with 0.2% Triton (100% death).

2.3.3. Reactive Species (RS)

The production of intracellular reactive species was evaluated using the dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) probe, which is permeable to the cell membranes and hydrolyzed by intracellular esterases in a non-fluorescent compound that can be oxidized to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (Amoroso et al., 1999). DCF is a highly fluorescent compound that can be detected by fluorescence spectroscopy with excitation of 490 nm and emission of 520 nm (Quispe et al., 2018). Cells were seeded in a 12-well plate at a density of 9.0×10^3 cells/cm³. After 24 h, cells were treated with 0.5% EtOH (vehicle), 0.5 μ M of probucol, **C1** or **C2**. After 24 h, the medium was replaced by fresh DMEM supplemented with 3% FBS and 3 mM glutamate. After 6 h, cells were washed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and incubated with 1 μ M DCFH-DA for 30 min at 37°C in the dark. After

incubation, adherent cells were harvested by the addition of 0.05% trypsin-EDTA for 3 min and washed with HBSS. The cell suspension was centrifuged at 1,200 x g for 3 min at room temperature and resuspended in HBSS; this procedure was repeated twice and the fluorescence intensity in the suspension was analyzed using the FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA), recording 10,000 events per sample. The results were expressed as percentage of the control (untreated cells).

2.3.4. Glutathione levels

Reduced glutathione (GSH), which represents approximately 95% of the cellular non-protein thiols (NPSH), was measured as previously described (Ellman, 1959). Cells were treated with 3 mM glutamate for 6 h (as described in 2.3.1). Thereafter, cells were collected with 0.5% Triton in phosphate buffered saline (PBS), then precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 5,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was incubated with 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in 1 mM phosphate buffer pH 7.0. Absorbance was measured at 412 nm and standard curve with GSH was used to quantify the data, which is calculated in nmol/mg protein and expressed as percentage of control (not treated cells).

2.3.5. Electron-transfer-based antioxidant assay

The reducing potentials of probucol and its analogues were evaluated via the cell-free 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay (Brand-Williams et al., 1995). In brief, 25 µM probucol, *C1* or *C2* were incubated for 30 min with 500 µM DPPH in methanol at room temperature. Trolox (25 µM) was used as positive control. Spectrophotometric readings were performed at a wavelength of 517 nm. Background absorption of DPPH alone was subtracted from all values. The ability of probucol and its analogues to reduce DPPH (% antioxidant activity) was calculated using the following equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(A-B) / A] \times 100$$

A= absorbance of the DPPH solution (at 517 nm) without sample;

B= absorbance of the DPPH solution (at 517 nm) with sample.

2.4. *IN VIVO* STUDY WITH RATS

2.4.1. Subjects

Animals were monitored in accordance with the IMPROVE guidelines (Percie du Sert et al., 2017) and the experimental protocol was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Santa Catarina (UFSC, Florianopolis, Brazil) - protocol number 3862280317. The animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010). Adult male Wistar rats (90 days old; $n = 87$), weighing 370 g, were obtained from the animal facility of UFSC. Only male rats were used, as female rats are regarded as more resistant than males to the effects of ET-1-induced stroke (El-Hakim et al., 2021). Animals were kept in pairs in standard polypropylene cages (40 x 32 x 17 cm) with freely available water and food (Nuvilab CR-1 - Quimtia) within a 12 h light/dark cycle (6 a.m./6 p.m.). Before experimental procedures, the animals underwent a period of 10 days of adaptation to the researchers and the laboratory. Thereafter, animals were numbered on day minus two (-2) (Fig. 1) and randomly assigned to one of the four experimental groups before surgery, with an online number generator (www.random.org). After stroke induction, the presence, absence or reduction of physical and behavioral parameters such as weight loss, piloerection, grooming and feeding were observed (Percie du Sert et al., 2017). Facial changes related to pain (Grimace scale) were also monitored (Sotocinal et al., 2011). Signs and symptoms such as weight loss greater than 20%, lack of mobility and response to stimulation, convulsions and the presence of barrel rolling were classified as severe and the animals that presented them were euthanized (Percie du Sert et al., 2017).

2.4.2. Sample size calculation and experimental number

Sample size calculation was performed using the Statistica software, version 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2008). Considering a goal power = 0.8 and $\alpha = 0.05$, the sample size calculation was performed based on a first experimental set of animals, whose results were later added to the main study (composed of 4 experimental sets); details in Supplemental Tables 2 and 3.

2.4.3. Preliminary toxicological evaluation

Before the *in vivo* experiments on focal ischemia (item 2.4.4), a preliminary toxicological study was performed to investigate the possible *in vivo* toxicity of the probucol analogues (**C1** and **C2**). In brief, 16 animals were randomly divided into 7 groups, as follows: (i) vehicle (canola oil, n = 4); (ii) 10 mg/kg **C1** (n = 2); (iii) 25 mg/kg **C1** (n = 2); (iv) 100 mg/kg **C1** (n = 2); (v) 10 mg/kg **C2** (n = 2); (vi) 25 mg/kg **C2** (n = 2); (vii) 100 mg/kg **C2** (n = 2). The doses used in this preliminary toxicological evaluation were based on our previous study with probucol (Santos et al., 2012), which reported neuroprotection and no evident toxicity in mice subjected to daily i.p. injections of probucol (10 mg/kg during 2 months). Animals received i.p. injections of the compounds once a day for four days. Toxicity evaluated was based on the mortality rate and body weight loss (Supplemental Fig. 2).

2.4.4. Focal ischemia protocol (surgical procedures)

Animals were initially numbered on day minus two (-2) (Fig. 1) and randomly assigned to one of the four experimental groups before surgery, with an online number generator (www.random.org). On day 1 (surgery day), the animals were anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg). The head hair was trimmed with scissors and the area was cleaned with alcoholic iodine solution. Each animal was positioned in the stereotaxic apparatus (Kopf Instruments) and a vertical midline incision was made to expose the skull suture lines. Using Bregma as a reference, three holes were made in the skull, with a dental drill, in the following coordinates (Windle et al., 2006):

A: Right motor cortex, anteroposterior (AP) = 0.0 mm, mediolateral (ML) = -2.5 mm, dorsoventral (DV) = -2.3 mm;

B: Right motor cortex, AP = +2.3 mm, ML = -2.5 mm, DV = -2.3 mm;

C: Right dorsolateral striatum, AP = +0.7 mm, MP = -3.8 mm, DV = -7.0 mm.

For each site, 2 μ L of ET-1 (800 pmol) or vehicle (sterile saline, NaCl 0.9%) were injected, representing a total of 6 μ L per animal. ET-1 was injected at a rate of 0.5 μ L/min, with an interval of 1 min per microliter (Windle et al., 2006). Needles were removed from the injection sites at 3 min following each injection. The incision was closed and the animal received postoperative support with flunixin meglumine (2.5 mg/kg) and saline (NaCl 0.9%) warmed to body temperature, administered subcutaneously, according to the IMPROVE

Guidelines (Percie du Sert et al., 2017). An intramuscular injection of a veterinary pentabiotic (24,000 IU/kg, suspension with streptomycin and penicillin) was administered to prevent infections. Finally, the animals recovered in pairs in their cages, with water and food easily accessible. Brain regions and ET-1 concentration (800 pmol) were chosen according to a previous study, which reported a survival rate of 77%, and 100% of survivors with behavioral deficits (Windle et al., 2006). Supplemental Fig. 3 depicts the stereotaxic injection sites of ET-1.

2.4.5. Poststroke treatment

Based on the results of the preliminary toxicological evaluation (Supplemental Fig. 2), **C2** was the only probucol analogue studied in the focal ischemia model. **C2** was diluted in canola oil (used as vehicle in the control group) and concentrations of 20 mg/kg and 50 mg/kg (based in preliminary toxicological evaluation) were used. The treatment consisted of a single i.p. injection, once a day for four days (days 1, 2, 3, 4 – Fig. 1), starting approximately 1 h after the beginning of the surgical procedures (ET-1 administration).

2.4.6. Behavioral tests

All behavioral tests were performed on days 0 and 5 (Fig. 1). Training sessions for the beam balance test were performed on days -2 and -1 (Hausser et al., 2018; Schaar et al., 2010), when the animals were also acclimated to the acrylic cylinder used in the Cylinder Test and Adhesive Removal Test (described below).

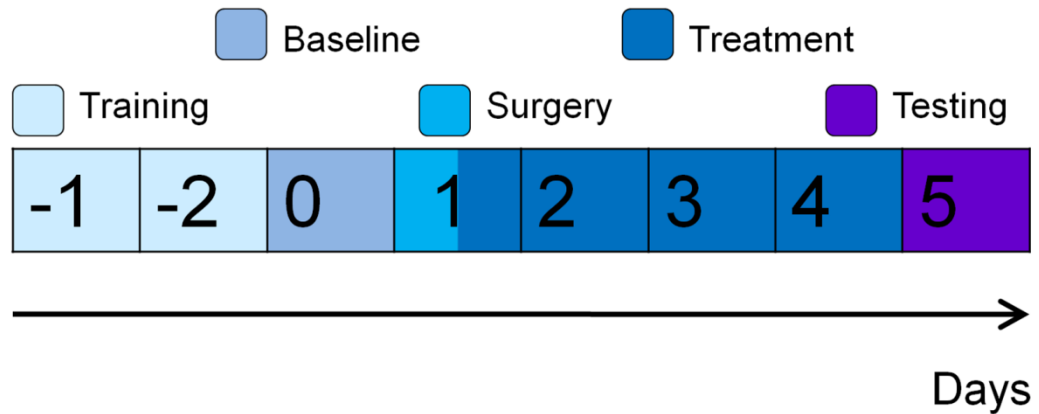
Figure 1

Figure 1: Design of the experimental *in vivo* protocol. The figure depicts the experimental protocol adopted in the study and its progression in days. Training: animals were trained in Beam Balance Test. Baseline: animals' performances in all behavioral tests were evaluated before surgeries. Surgery: cerebral stereotaxic injection of ET-1. Treatment: intraperitoneal administration of canola oil (vehicle) or C2. Testing: behavioral assessments.

2.4.7. Cylinder Test

Considering that ET-1 was injected only in the right hemisphere, we took advantage of the Cylinder Test (CT) to evaluate locomotor asymmetry. Animals were placed in an acrylic cylinder (diameter, 20 cm; height, 50 cm) and the spontaneous use of the forelimbs was evaluated for 3 min (Ploughman et al., 2009). Briefly, during vertical exploration, the number of ipsilateral (A) and contralateral (B) contacts with the cylinder wall was recorded. To express the asymmetry in the use of the anterior contralateral limb, the following formula was applied (Ploughman et al., 2009):

$$[B / (A+B)] \times 100$$

2.4.8. Bean Balance Test

The balance of the animals was investigated through the Beam Balance Test (BBT) (Hausser et al., 2018). Briefly, rats were placed individually on a wooden beam (length, 60

cm; width, 1.75 cm) and their exploratory activity was evaluated during 3 sessions of 1 min each, with intervals of 1 min, afterwards, the average of these values was calculated (Hausser et al., 2018). The wooden beam was positioned at a height of 80 cm from the floor and had a barrier (height, 40 cm) to prevent the animal from advancing, which forced the rats to maintain balance in the selected area of the beam. Behavioral analyses were performed using a previously published scoring system according to the animal's performance in the test (Hausser et al., 2018). It is important to mention that, before tests, training sessions were performed on days -1 and -2 (Fig. 1) and rats were considered trained after achieving three scores of 1 or 2 (Hausser et al., 2018). No animals were injured in this test; there was a cushioned safety box under the wooden beam, preventing any accident with the animals.

2.4.9. Adhesive Removal Test

The impairment of sensorimotor functions was investigated through the Adhesive Removal Test (ART) (Balkaya et al., 2013; Rewell et al., 2017). Briefly, with a quick physical restriction of the animal, a square adhesive tape (6 x 6 mm) was attached to the palm of each forepaw. The tape was attached in a random order and before the start of the test both forepaws were touched, avoiding bias (Rewell et al., 2017). The test was conducted on the CT cylinder and the time to remove each adhesive was recorded for a maximum of 5 min.

2.4.10. Sample processing

After the end of behavioral tests, animals were anesthetized (similarly to item 2.4.4) and perfused transcardially with phosphate buffer (0.1 M) and formaldehyde (4%). The brains were removed and postfixed in formaldehyde (4%) for 24 h. Afterwards, the brains were subjected to sucrose solutions (10%, 20% and 30%) for cryoprotection and stored at -80°C. Subsequently, the brain areas of interest were cut (20 µm thick) in cryostat and stored in a refrigerator, submerged in phosphate buffer (0.1 M) with sodium azide (0.5%).

2.4.11. Immunohistochemical analyses

Twenty (20) µm free-floating cryostat coronal sections were obtained. The free-floating sections were permeabilized with the washing buffer (0.15% Triton X-100 in 0.1 M

PBS), and then incubated for 30 min with 0.3% H₂O₂ to inhibit endogenous peroxidases. Nonspecific binding sites were blocked with 5% normal goat serum. After 3 washing cycles, the sections were incubated with the primary antibody anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:500) diluted in washing buffer with 0.02% thimerosal for approximately 18 h at 4°C. Afterwards, samples were incubated for 1 h at room temperature with the peroxidase-conjugated secondary antibody (1:500), with subsequent exposure to 3,3-diaminobenzidine (DAB), resulting in a brown color precipitate. All images were acquired using the Axio Scan.Z1 slide scanner (Zeiss, Germany). Afterwards, high resolution images of the ROI (striatum) were generated in ZEN 3.4 (blue edition) and analyzed in ImageJ (National Institutes of Health, USA). The analysis consisted of quantifying the percentage of area covered by positive GFAP astrocytes (four sections per animal), through integrated density, i.e., the sum of pixels of positive GFAP astrocytes within the same threshold was quantified.

2.5. STATISTICAL ANALYSIS

Initially, Grubbs' test, also called the ESD (extreme studentized deviate) method, was performed to detect and exclude significant outliers. Data were subjected to D'Agostino & Pearson's normality test. *In vitro* data were analyzed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. *In vivo* data were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Graphics and ANOVAs were performed using the Graph-Pad PRISM® software version 7.0a (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Sample size calculation was performed using Statistica software, version 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2008). The results were expressed as mean ± S.D. and significance was considered when $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Excess glutamate causes oxidative damage in HT22 cells

In neuronal HT22 cells, which do not express N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors (Tobaben et al., 2011), excess glutamate inhibits the cystine/glutamate antiporter system X_c⁻ and induces ferroptosis (Tang et al., 2020), a nonapoptotic form of regulated necrosis involved in several pathological conditions, including ischemic events

(Alim et al., 2019; Datta et al., 2020; Stockwell et al., 2017). We have previously observed the involvement of ferroptosis in this *in vitro* model since HT22 cell death is not only preceded by significant lipid peroxidation (a ferroptosis driver), but also rescued by the classic anti-ferroptotic agent Ferrostatin-1 (Naime et al., 2021). Here, glutamate caused concentration-dependent decrease in the cellular metabolic viability (Fig. 2A) at 24 h after treatment [$F(5, 12) = 39.82$; $p < 0.0001$], with an IC_{50} of 3.42 mM. Under the same experimental condition, glutamate significantly increased cell death [$F(5, 12) = 13.50$; $p = 0.0001$], also in a concentration-dependent manner (Fig. 2B). In time-dependent experiments, HT22 cells were exposed to a fixed glutamate concentration (3 mM) during 1, 3, 6 and 24 h. Glutamate significantly decreased cellular metabolic viability (Fig. 2C) [$F(4, 25) = 16.77$; $p < 0.0001$] and increased cell death (Fig. 2D) [$F(4, 25) = 22.08$; $p < 0.0001$], although *post hoc* analysis showed significant differences only at 24 h after treatment ($p < 0.0001$); no significant effects were observed in the previous evaluated time points (6, 3 and 1 h) (Fig. 2C and D). Based on these results, the exposure to 3 mM glutamate during 6 h was chosen in order to investigate the levels of GSH, whose depletion represents a classic hallmark of the ferroptotic death induced by glutamate (Tang et al., 2020). Even though no significant changes in metabolic viability and cell death rates were observed at this condition (3 mM glutamate during 6 h, Figs. 2C and 2D), a significant (50%) depletion of GSH levels was observed (Fig. 2E) [$t = 3.131$, $df = 8$; $p = 0.014$], confirming the occurrence of an event underpinning glutamate-induced ferroptosis.

Figure 2

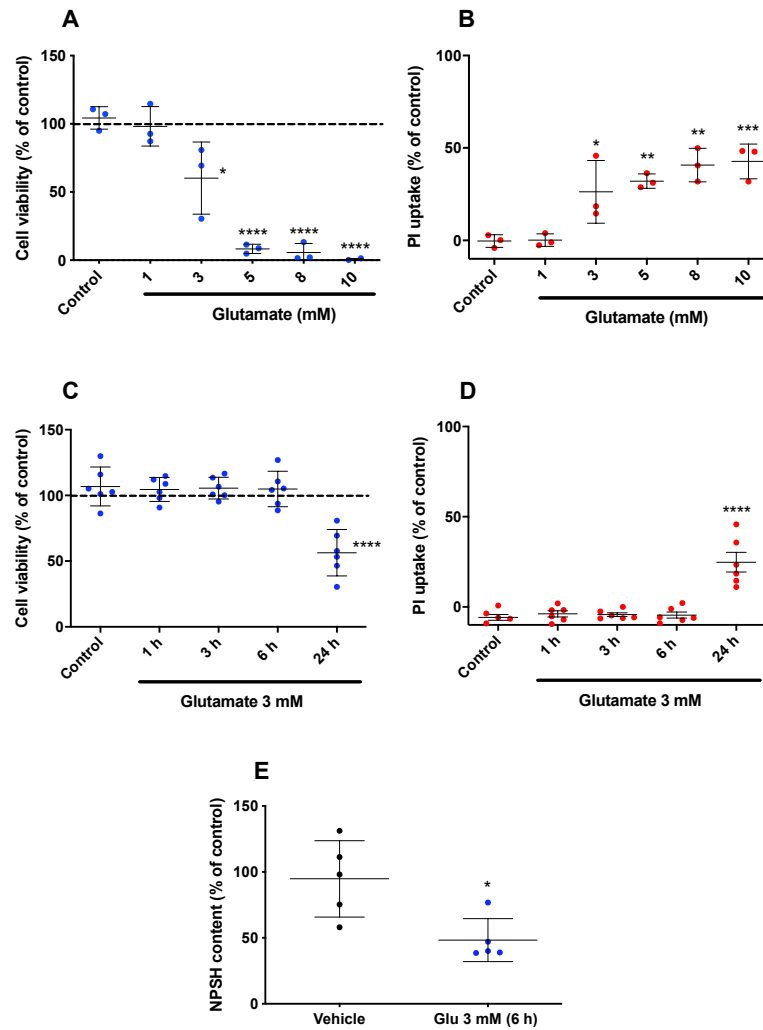


Figure 20: Glutamate-mediated oxidative cytotoxicity in HT22 cells. Cells were treated with different glutamate concentrations (1-10 mM) and after 24 h, metabolic cell viability (Panel A) and cell death (Panel B) were evaluated. Cells were treated with glutamate 3 mM and at different time-points (1, 3, 6 and 24 h), metabolic cell viability (Panel C) and cell death (Panel D) were evaluated. Cells were treated with 3 mM glutamate and glutathione (NPSH) levels were measured after 6 h (Panel E). Data are presented as mean \pm S.D. Independent experiments were performed ($n = 3-6$) and each dot represents the average of 3 technical replicates. One-way ANOVA (A-D) was performed, followed by Tukey's test. (E) Student unpaired T test was performed. Asterisks indicate significant differences compared to the respective control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.2. *C1* and *C2* are not cytotoxic and protect against the oxidative toxicity induced by glutamate and *tert*-butyl hydroperoxide in HT22 cells

To select proper concentrations of probucol, *C1* and *C2* for the following studies, their own effects on metabolic cell viability and cell death were firstly investigated. After exposure to different concentrations (0.5, 1, 3 and 5 μ M) of probucol, *C1* or *C2* during 48 h, no significant changes in metabolic cell viability and cell death were observed (Supplemental Fig. 4). These results not only indicate absence of significant cytotoxicity of the investigated compounds at the used concentrations, but also indicate that they do not increase cell proliferation (no significant *increases* in metabolic cell viability were observed), which is critical to proper interpret results concerning toxicity and protection in models of proliferating cells.

To investigate the potential protective effects of probucol, *C1* or *C2*, cells were exposed during 24 h to two glutamate concentrations: 3 mM, which causes a 50% decrease in cell viability, and 5 mM, which is extremely deleterious and causes a 90% decrease in cell viability (Fig. 3A). In fact, glutamate treatment exhibited significant main effects on cell viability [$F(2, 72) = 116.7, p < 0.0001$] and cell death [$F(2, 72) = 29.50; p < 0.0001$]. Although *post hoc* analysis showed that probucol treatment failed to protect against glutamate-induced cytotoxicity (Figs. 3A and 3B), *C1* or *C2* displayed significant protective effects, regardless of the used glutamate concentration (Figs. 3A and 3B). Although *C1* or *C2* protected against glutamate-induced cytotoxicity, they were unable to mitigate glutamate-induced GSH depletion (Fig. 3C). On the other hand, *C1* or *C2* significantly mitigated glutamate-induced increase in oxidant reactive species (Fig. 3D), pointing to antioxidant properties of *C1* or *C2*. Corroborating this result, *C1* or *C2*, but not probucol, protected against the cytotoxicity induced by 50 μ M *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) (Fig. 3E), a pro-oxidant molecule that has also been reported to cause ferroptosis in cultured cells (Wenz et al., 2018).

Figure 3

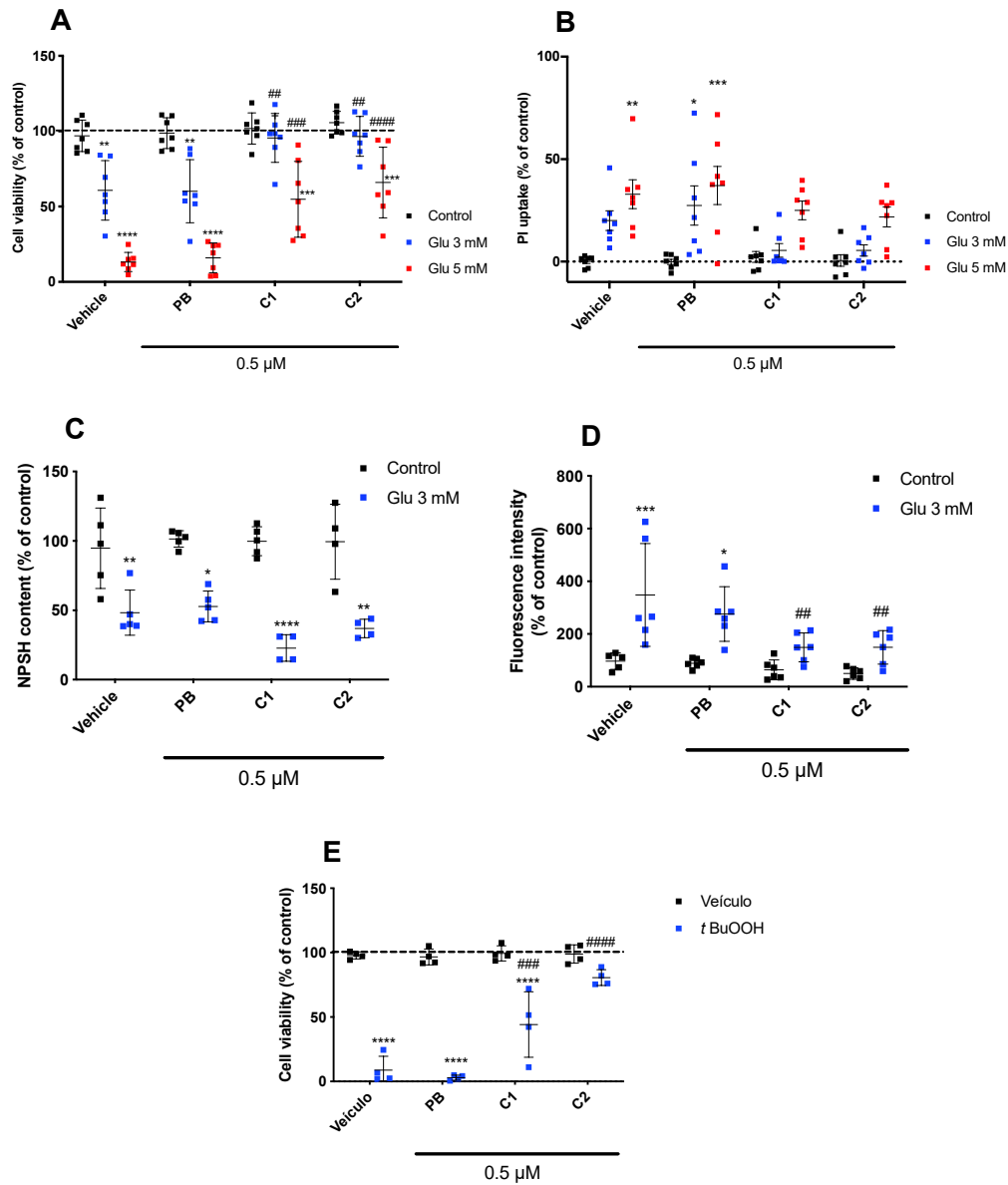


Figure 3: Probucool analogues protects against glutamate and *t*-BuOOH oxidative damage. At 24 h after seeding, cells were treated with 0.5 μM of probucol (PB), *C1* or *C2*. After 24 h, cells were treated with 3 or 5 mM glutamate (Panels A-D) or 50 μM *t*-BuOOH (E). Metabolic cell viability (Panel A) and cell death (Panel B) were evaluated 24 h after glutamate treatment. Glutathione (NPSH) levels and reactive species were measured 6 h after glutamate treatment (Panels C and D). At 24 h after *t*-BuOOH (50 μM) treatment, metabolic cell viability was evaluated by the MTT assay (Panel E). Data are presented as mean ± S.D. Independent experiments were performed (n = 3-6) and each dot represents the average of 3 technical replicates. Two-way ANOVA was performed, followed by Tukey's test. Symbols indicate significant differences: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001 compared to the respective control (cells not treated with glutamate). # p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001; #### p < 0.0001 compared do the respective control (cells not treated with protective agents and treated only with *t*-BuOOH or the respective glutamate concentration).

The reducing potentials of probucol, *C1* and *C2* were measured in a cell-free condition to investigate whether the observed cytoprotective effects of *C1* and *C2* (Fig. 3) could be related to direct antioxidant capacities. At equimolar concentrations, probucol has, together with trolox (positive control), the highest hydrogen donating capacity compared to *C1* and *C2* (Fig. 4). Notably, probucol showed no significant cytoprotective effects against glutamate- and *t*-BuOOH-induced damage (Fig. 3). On the other hand, *C2*, which displayed significant cytoprotective effects against glutamate-induced ferroptosis, showed the lowest antioxidant capacity (Fig. 4). These results strongly suggest that the observed cytoprotective effects of *C1* and *C2* are not caused by direct antioxidant properties.

Figure 4

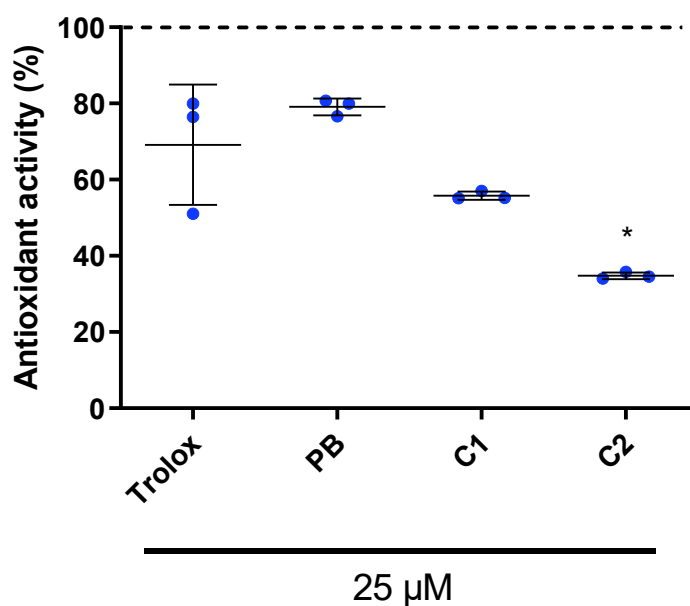


Figure 4: Probucol analogues have low reducing potential. The reducing potentials (direct antioxidant capacities) of Probucol (PB), *C1* and *C2*, at equimolar concentration (25 μM), were evaluated and quantified by cell-free DPPH assay. Trolox (25 μM) was used as positive control. Data are presented as mean ± S.D. Three independent experiments were performed (n = 3) and each dot represents the average of 3 technical replicates. One-way ANOVA was performed, followed by Tukey's test. Asterisks indicate significant differences compared to the positive control Trolox (* p < 0.05).

3.3. C2 rescued forelimb use asymmetry induced by ET-1

The average percentage of use of the contralateral limb in control animals was 49.32%, which was analogous to levels measured for all the enrolled animals before ET-1 administration (baseline before surgery = 48.9%) (Fig. 5). ET-1 caused a significant asymmetry in the use of forelimbs during vertical exploration [$F(1, 51) = 22.35$; $p < 0.0001$]; there was a significant reduction ($\cong 50\%$) in the spontaneous use of the contralateral limb when making contacts on the cylinder walls (Fig. 5). Compared to controls, no significant changes in the percentage of use of the contralateral limb were observed in animals subjected to the focal ischemia protocol (ET-1 administration) and treated with C2, regardless of the administered dose (Fig. 5), which is in agreement with the significant ET-1 by C2 interaction [$F(2, 51) = 7.444$; $p = 0.0015$].

3.4. C2 recovered the balance impairment induced by ET-1

In the beam balance test, the scores 1 and 2 are considered normal (Hausser et al., 2018). In agreement, we found an average score of 1.84 for all the enrolled animals before surgery. On the fourth day after surgery, control rats scored an average of 2.11, i.e., visible balance with all members on the beam and exploratory movements without falls (Fig. 6). ET-1 induced a significant impairment in the balance of the rats [$F(1, 51) = 15.51$; $p = 0.0002$], measured by locomotion deficits, higher frequency of use of ipsilateral members in the beam and falls during the test (Fig. 6). Animals exposed to ET-1 scored an average of 2.93, which was significantly different from control score. Of note, 100% of ET-1-treated animals showed scores higher than the average of the control group (2.11). C2 exhibited significant main effect in the beam balance test [$F(2, 51) = 3.460$; $p = 0.0390$], which is in agreement with the no significant changes in animals subjected to the focal ischemia protocol (ET-1 administration) and treated with C2 compared to controls, regardless of dose (Fig. 6).

Figure 5

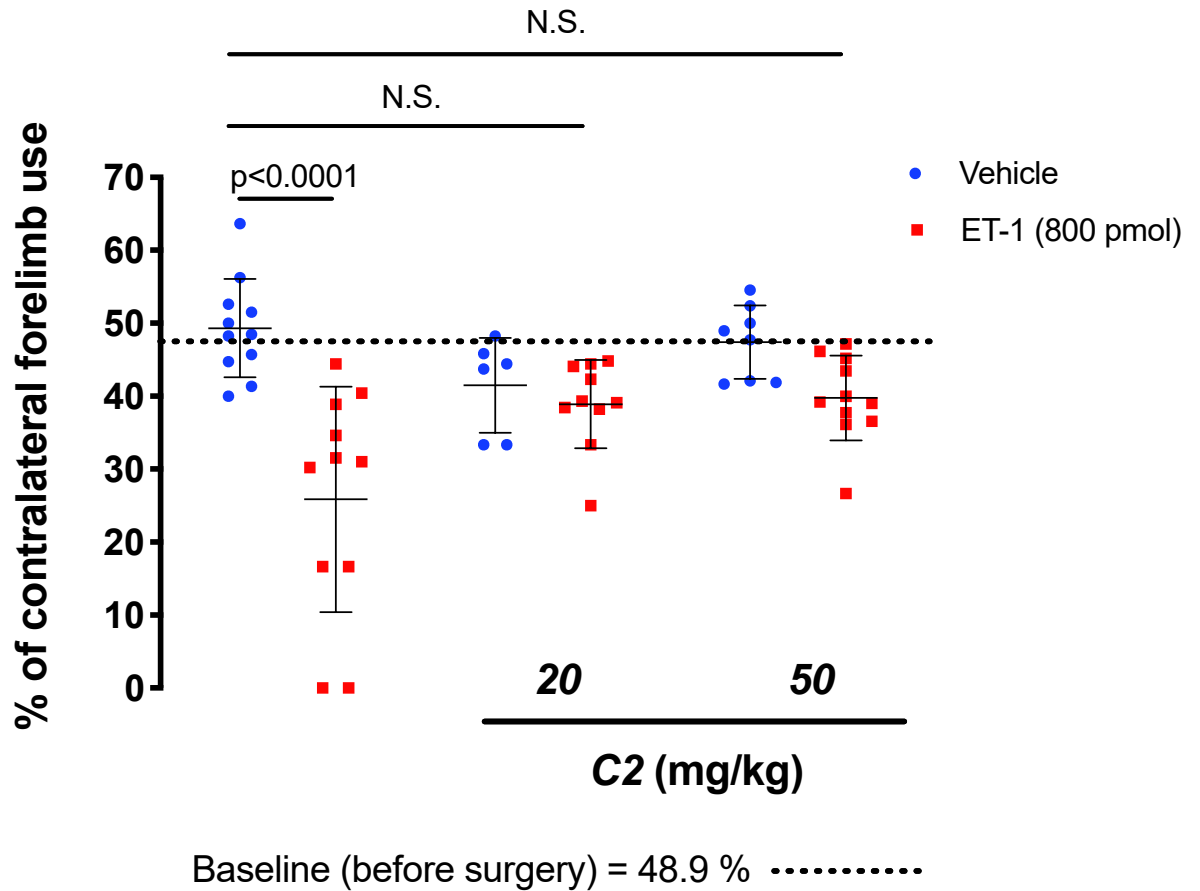


Figure 5: Probuco analogue C2 improves performance in the Cylinder Test. Impaired motor symmetry was evaluated by quantifying the percentage of contralateral use (details in Methods Section), which was near to 50% (48.9%) in baseline analyses performed before surgeries (dotted line). The spontaneous use of the contralateral forelimb was significantly reduced in ET-1-treated animals ($p < 0.0001$), but animals treated with ET-1 + C2 were not different from controls. Results are expressed as mean \pm SD. Following D'Agostino & Pearson's normality test, a two-way ANOVA was performed, followed by Tukey's post hoc test. N.S. = non-significant.

Figure 6

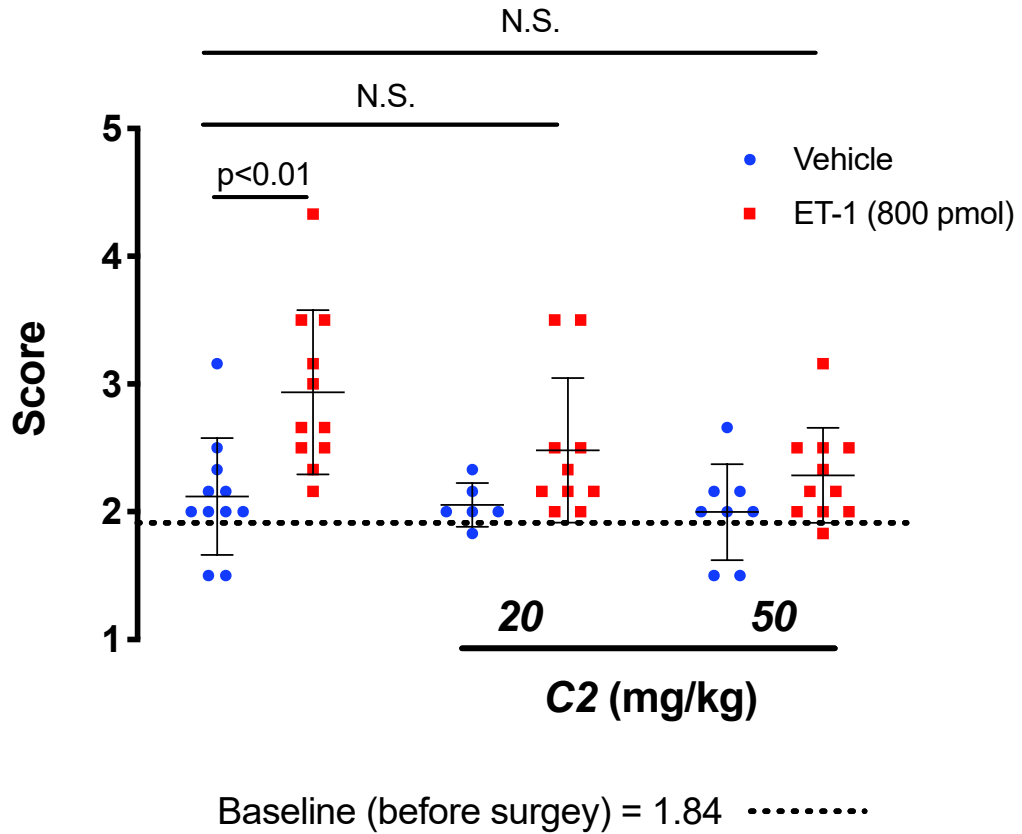


Figure 6: Probulcol analogue C2 improves performance in the Beam Balance Test. Balance was scored from 1 to 5 (details in Methods Section). Baseline analyses performed before surgeries indicated an average basal score of 1.84 (dotted line). Balance score was significantly increased in ET-1-treated animals ($p < 0.01$), but animals treated with ET-1 + C2 were not different from controls. Results are expressed as mean \pm SD. Following D'Agostino & Pearson's normality test, a two-way ANOVA was performed, followed by Tukey's post hoc test. N.S. = non-significant.

3.5. Effects of C2 in the sensorimotor deficit induced by ET-1

The Adhesive Removal Test (ART), which is commonly used to investigate stroke related impairments of tactile extinction, showed that animals from the control group removed the adhesive from the contralateral limb in an average of 13.09 s, a value close to the baseline before surgery (14.7 s) (Li et al., 2001; Rewell et al., 2017). On the other hand, the ischemic group (ET-1 alone) took an average of 204.72 s to remove the adhesive from the contralateral limb, indicating a marked sensorimotor deficit (Fig. 7) [$F(1, 51) = 32.89$; $p < 0.0001$]. In fact, several animals in the ET-1 group reached the maximum evaluated time (300 seconds) to

remove the contralateral adhesive. Even though two animals of each group treated with ET-1 + **C2** (20 or 50 mg/kg) also reached the maximum evaluated time and their average time required to remove the adhesive from the contralateral limb was near to 100 s, several animals treated with ET-1 + **C2** (regardless of dose) presented performances like of control animals. Of note, there were no significant differences when such groups were compared to controls; the apparent impairments in animals treated with ET-1 + **C2** did not reach statistical significance ($p = 0.12$ and 0.07). These groups showed a great dispersion of data and the individuals values depicted in Fig. 7 strongly suggest that **C2** protects part of the individuals subjected to the focal ischemia protocol. Nonetheless, ET-1 by **C2** interaction was not significant [$F(2, 51) = 2.021$; $p=0.143$].

3.6. C2 inhibited ET-1-induced reactive gliosis

The behavioral deficits of the ischemic group (ET-1 alone) were accompanied by significant reactive gliosis (Figs. 8A and B) [$F(1, 24) = 57.06$; $p<0.0001$]. In fact, such animals had an average area coverage of GFAP positive astrocytes of 8.4%, a value three times greater than the control group (2.3% area covered). On the other hand, animals treated with ET-1 + **C2** (regardless of dose) showed a significant decrease in the area covered with positive GFAP astrocytes, when compared to the ischemic group (Fig. 8B). Animals that received ET-1 + 50 mg/kg **C2** did not differ statistically from the control group (Fig. 8B). In agreement, both **C2** main effect [$F(2, 24) = 4.347$; $p=0.0245$] and ET-1 by **C2** interaction [$F(2, 24) = 3.557$; $p=0.0444$] reached statistical significance. These results indicate that increased and/or long-lasting reactive gliosis is likely related to a worse behavioral outcome after the ischemic challenge in animals that received only ET-1. Indeed, we showed that animals treated with ET-1 + **C2** (regardless of dose), which exhibited a significant reduction in reactive gliosis, were also accompanied by behavioral performances similar to the control group.

Figure 7

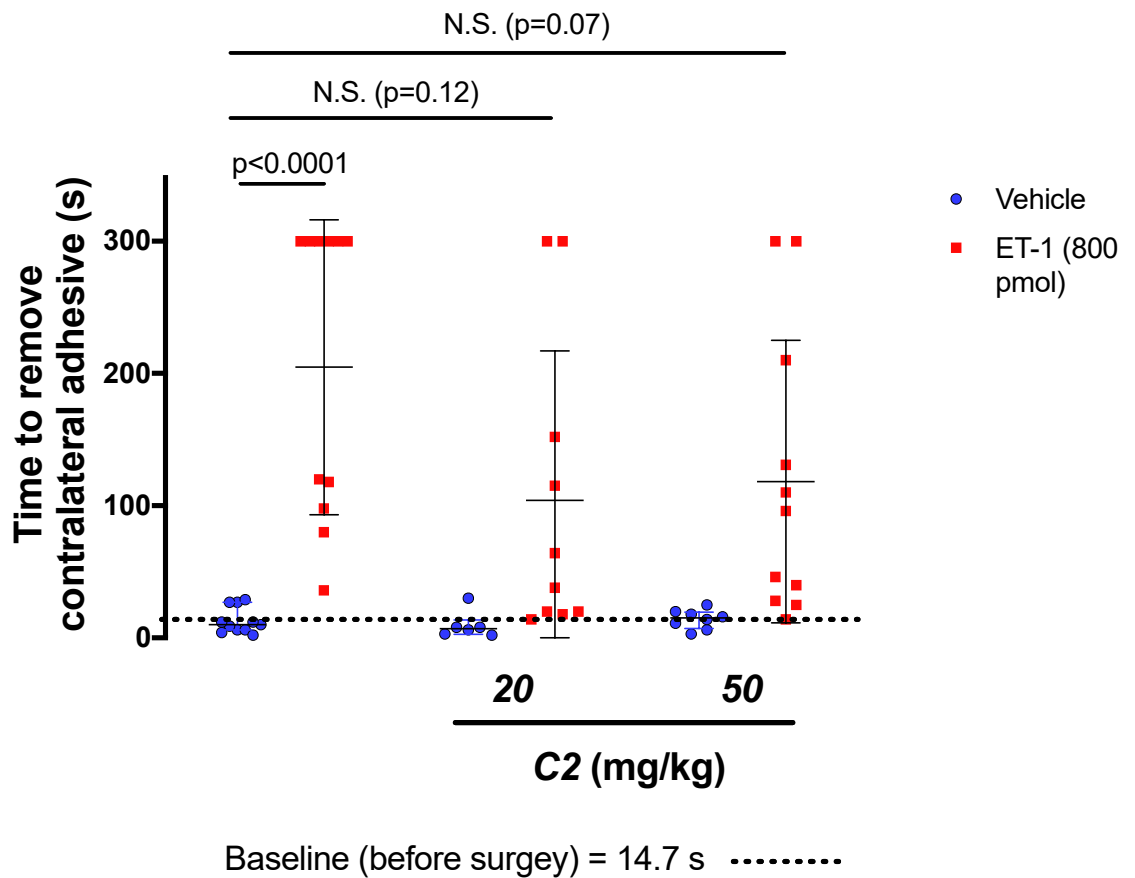


Figure 7: Probucol analog C2 improves performance in the Adhesive Removal Test. The time to remove the contralateral adhesive was measured (details in Methods Section). Baseline analyses performed before surgeries indicated a basal of 14.7 seconds (dotted line). The time to remove the contralateral adhesive was significantly increased in ET-1-treated animals ($p < 0.0001$), with several animals reaching the maximum evaluated time (300 seconds). Although two animals of each group treated with ET-1 + C2 (20 or 50 mg/kg) also reached the maximum evaluated time, several animals presented performances like that of control animals. Apparent impairments in animals treated with ET-1 + C2 did not reach statistical significance ($p = 0.12$ and 0.07). Results are expressed as mean \pm S.D. Following D'Agostino & Pearson's normality test, a two-way ANOVA was performed, followed by Tukey's post hoc test. N.S. = non-significant.

Figure 8

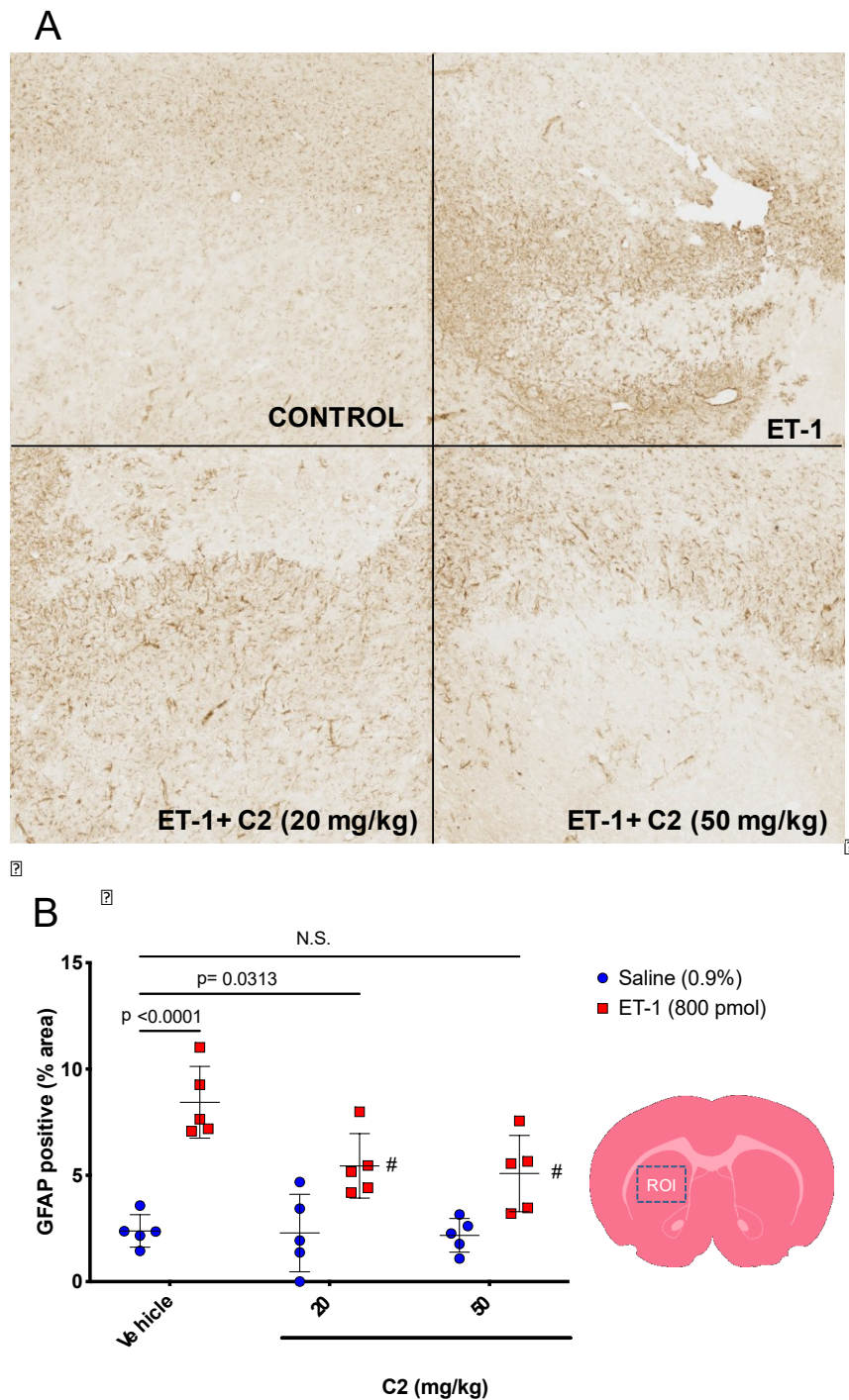


Figure 8. Probucol analog C2 reduces reactive gliosis. (A) Representative images showing significant reactive gliosis in the ischemic group (ET-1 alone, upper right). It is possible to observe a reduction in reactive gliosis in the groups treated with C2 (lower right and left) compared with the ischemic group. (B) Quantification of GFAP-positive cells. Results are expressed as mean \pm S.D. A two-way ANOVA was performed, followed by Tukey's post hoc test. N.S. = non-significant. # $p < 0.05$ statistical difference compared to the ischemic group (ET-1 alone). $n=5$ animals per group.

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In the present study, we designed and synthesized two novel probucol analogues [2,6-di-tert-Butyl-4-selenocyanatophenol (*Compound 1*, **C1**) and 4,4'-Diselanediybis (2,6-di-tert-butylphenol) (*Compound 2*, **C2**)] that, in contrast to the parent compound (probucol), exhibited substantial protective effects in an *in vitro* model of cellular injury induced by excess glutamate and characterized by significant ferroptosis (Naime et al., 2021). Due to the lack of glutamate NMDA receptors in HT22 cells (Tobaben et al., 2011), the molecular events leading to such cytotoxicity are essentially triggered by decreased cystine uptake through the xCT system, which culminates in GSH depletion and ferroptosis (Yan et al., 2021). Although we observed a significant decrease of GSH levels in glutamate-treated cells, corroborating data from previous studies based on similar approaches (Bueno et al., 2020; Naime et al., 2021), we observed no modulatory effects of **C1** and **C2** against glutamate-induced GSH depletion, indicating that their protective effects are not related to the mitigation of GSH depletion. Considering that probucol, which exhibited no cytoprotective effects against glutamate-induced ferroptosis, presented higher hydrogen donating capacity compared to **C1** and **C2**, the observed cytoprotective effects of both analogues seem to not be linked to direct antioxidant/reducing properties. Additionally, although the detailed mechanisms mediating the protective effects of **C1** and **C2** against glutamate-induced oxidative cytotoxicity are not completely understood, it is reasonable to state that both compounds increase the cell capability to cope with oxidant challenges; this idea is reinforced by the fact that **C1**- and **C2**-treated cells exhibited decreased levels of DCF-reacting oxidants after glutamate exposure and lower sensitivity to *t*-BuOOH.

Recent lines of evidence indicate that ferroptosis represents a potential target for the treatment of stroke (Xu et al., 2022). However, whether antiferroptotic drugs can protect against ischemic stroke injury under *in vivo* scenarios is presently unclear. Considering these elements, as well as the significant protective effects of **C1** and **C2** in our *in vitro* experimental model of ferroptosis with neuronal HT22 cells, we reasoned that both probucol analogues could present neuroprotective effects in an *in vivo* model of ischemic stroke. However, due to the significant toxic effects of **C1** *in vivo* (Supplemental Fig. 2), only **C2** was tested in *in vivo* ischemic stroke model, which was based on the central administration of the vasoconstrictor ET-1 (Windle et al., 2006). We observed that ET-1-treated animals exhibited significant impairments in all the three behavioral tests, which are classically used to score the

severity of ischemic stroke-mediated injury in rodents (Balkaya et al., 2013; Hausser et al., 2018; Ploughman et al., 2009; Rewell et al., 2017; Schaar et al., 2010). Remarkably, **C2** was able to improve behavioral outcomes in ischemic animals, highlighting, for the first time, the beneficial effects of an anti-ferroptotic probucol analogue in an *in vivo* scenario. From a pharmacological point of view, this result could conceivably be relevant considering the need for anti-ferroptotic agents with good ADME properties (Hofmans et al., 2016). The beneficial effect of **C2** in an *in vivo* model of ischemic stroke, which is in line with the fact that probucol and some analogues exhibit good ADME properties *in vivo* (Fellin et al., 1986; Tardif et al., 2008), points to anti-ferroptotic probucol analogues as potential adjuvants for treating ischemic stroke. Indeed, based on the recently described contribution of ferroptosis to stroke-mediated injury (Xu et al., 2022), one might posit that the association of anti-ferroptotic compounds (i.e., **C2**) with strategies that have been proven to mitigate cerebral ischemic injury by modulating events other than ferroptosis [i.e., therapies to restore ischemia-depleted ATP (Faller et al., 2017), to inhibit NMDA-receptor downstream signaling (Bach et al., 2019), or to decrease neurogenic inflammation (Sorby-Adams et al., 2019)] would provide improved stroke outcomes. Nevertheless, such associations represent a novel research area that deserves further investigation.

Reactive gliosis, which represents a reaction of astrocytes to brain injury, has also been reported after ischemic stroke (Shen et al., 2021). Notably, in stroke, several factors (the lesion itself, the ischemic environment, disrupted blood-brain barrier, the inflammatory response) can affect the extent and quality of reactive gliosis (Pekny & Nilsson, 2005), which is commonly quantified by the analyses of the tissue GFAP protein expression. Here, we observed a significant increase in the expression of striatal GFAP at 7 days after the onset of the ischemic episode, indicating the occurrence of reactive gliosis in the striatum of ET-1-treated rats. The ameliorative effects elicited by **C2** in striatal GFAP expression reinforce its neuroprotective effects in our *in vivo* model and highlight the link between the behavioral evaluated parameters and reactive gliosis in ET-1 treated rats.

In conclusion, the present study shows that two novel probucol analogues (**C1** and **C2**), in contrast to the parent compound, protect against glutamate-induced ferroptosis *in vitro*. Such protection was not linked to direct antioxidant properties or to the prevention of GSH depletion, although it was related to an increased capability to cope with oxidant challenge. Consistent with these *in vitro* findings, **C2**, which caused no evident toxicity, displayed significant neuroprotective effects in an *in vivo* model of focal ischemic stroke in

rats, leading to significant functional improvements. These effects of **C2** in our *in vivo* model, which are in line with the already reported good ADME properties of probucol and some analogues, points to **C2** as a potential new drug to treat ischemic stroke and/or further ferroptosis-related pathological conditions.

Declaration of interest: none

Acknowledgements: This study was funded in part by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) to Farina M (research grants 405426/2021-6, 302952/2018-7 and 404666/2018-3). Jacques MT thanks Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) for a doctoral scholarship. Authors are grateful to the Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia at the Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/UFSC) for providing its infrastructure for carrying out biochemical analysis.

References

- Alim, I., Caulfield, J. T., Chen, Y., Swarup, V., Geschwind, D. H., Ivanova, E., . . . Ratan, R. R. (2019). Selenium Drives a Transcriptional Adaptive Program to Block Ferroptosis and Treat Stroke. *Cell*, *177*(5), 1262-1279.e1225. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.032>
- Amoroso, S., Gioielli, A., Cataldi, M., Di Renzo, G., & Annunziato, L. (1999). In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca²⁺ increase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1452*(2), 151-160. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(99\)00110-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4889(99)00110-X)
- Bach, A., Clausen, B. H., Kristensen, L. K., Andersen, M. G., Ellman, D. G., Hansen, P. B. L., . . . Strømgaard, K. (2019). Selectivity, efficacy and toxicity studies of UCCB01-144, a dimeric neuroprotective PSD-95 inhibitor. *Neuropharmacology*, *150*, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.035>.
- Balkaya, M., Kröber, J. M., Rex, A., & Endres, M. (2013). Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *33*(3), 330-338. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.185>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brouns, R., & De Deyn, P. P. (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *111*(6), 483-495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2009.04.001>
- Bueno, D. C., Canto, R. F. S., de Souza, V., Andreguetti, R. R., Barbosa, F. A. R., Naime, A. A., . . . Farina, M. (2020). New Probucol Analogues Inhibit Ferroptosis, Improve Mitochondrial Parameters, and Induce Glutathione Peroxidase in HT22 Cells. *Molecular Neurobiology*, *57*(8), 3273-3290. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01956-9>
- Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(1), 70. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
- Collaborators, G. B. D. L. R. o. S., Feigin, V. L., Nguyen, G., Cercy, K., Johnson, C. O., Alam, T., . . . Roth, G. A. (2018). Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *The New England journal of medicine*, *379*(25), 2429-2437. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804492>
- Colle, D., Hartwig, J. M., Antunes Soares, F. A., & Farina, M. (2012). Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. *Brain Research Bulletin*, *87*(4), 397-405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.01.003>
- Colle, D., Santos, D. B., Hartwig, J. M., Godoi, M., Engel, D. F., de Bem, A. F., . . . Farina, M. (2016). Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1280-1295. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9086-x>
- Colle, D., Santos, D. B., Moreira, E. L. G., Hartwig, J. M., dos Santos, A. A., Zimmermann, L. T., . . . Farina, M. (2013). Probucol Increases Striatal Glutathione Peroxidase

- Activity and Protects against 3-Nitropropionic Acid-Induced Pro-Oxidative Damage in Rats. *PLOS ONE*, 8(6), e67658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067658>
- Datta, A., Sarmah, D., Mounica, L., Kaur, H., Kesharwani, R., Verma, G., . . . Bhattacharya, P. (2020). Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Translational Stroke Research*, 11(6), 1185-1202. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00806-z>
- Dixon, Scott J., Lemberg, Kathryn M., Lamprecht, Michael R., Skouta, R., Zaitsev, Eleina M., Gleason, Caroline E., . . . Stockwell, Brent R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- El-Hakim, Y., Mani, K. K., Eldouh, A., Pandey, S., Grimaldo, M. T., Dabney, A., . . . Sohrabji, F. (2021). Sex differences in stroke outcome correspond to rapid and severe changes in gut permeability in adult Sprague-Dawley rats. *Biology of sex differences*, 12(1), 14-14. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00352-1>
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Faller, K. M. E., Leach, J., Johnston, P., Holmes, W. M., Macrae, I. M., Frenguelli, B. G. (2017). Proof of concept and feasibility studies examining the influence of combination ribose, adenine and allopurinol treatment on stroke outcome in the rat. *Brain and Neuroscience Advances*, 1, 1-13. <https://doi.org/10.1177/2398212817717112>
- Fellin, R., Gasparotto, A., Valerio, G., Baiocchi, M. R., Padrini, R., Lamon, S., . . . Crepaldi, G. (1986). Effect of probucol treatment on lipoprotein cholesterol and drug levels in blood and lipoproteins in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 59(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(86\)90032-8](https://doi.org/10.1016/0021-9150(86)90032-8)
- Ferro, J. M., Caeiro, L., & Figueira, M. L. (2016). Neuropsychiatric sequelae of stroke. *Nature Reviews Neurology*, 12(5), 269-280. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.46>
- Hausser, N., Johnson, K., Parsley, M. A., Guptarak, J., Spratt, H., & Sell, S. L. (2018). Detecting Behavioral Deficits in Rats After Traumatic Brain Injury. *Journal of visualized experiments : JoVE*(131), 56044. <https://doi.org/10.3791/56044>
- Hofmans, S., Berghe, T. V., Devisscher, L., Hassannia, B., Lyssens, S., Joossens, J., . . . Augustyns, K. (2016). Novel Ferroptosis Inhibitors with Improved Potency and ADME Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(5), 2041-2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01641>
- Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*, 17(7), 796-808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>
- Jung, Y. S., Park, J. H., Kim, H., Kim, S. Y., Hwang, J. Y., Hong, K. W., . . . Shin, H. K. (2016). Probucol inhibits LPS-induced microglia activation and ameliorates brain ischemic injury in normal and hyperlipidemic mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(8), 1031-1044. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.51>
- Kaji, R. (2019). Global burden of neurological diseases highlights stroke. *Nature Reviews Neurology*, 15(7), 371-372. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0208-y>
- Karthikeyan, S., Jeffers, M. S., Carter, A., & Corbett, D. (2019). Characterizing Spontaneous Motor Recovery Following Cortical and Subcortical Stroke in the Rat. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 33(1), 27-37. <https://doi.org/10.1177/1545968318817823>
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal

- Research. *PLOS Biology*, 8(6), e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>
- Li, Y., Chen, J., Wang, L., Lu, M., & Chopp, M. (2001). Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology*, 56(12), 1666-1672. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.12.1666>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Moustafa, R. R., & Baron, J.-C. (2008). Pathophysiology of ischemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), S44-S54. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707530>
- Naime, A. A., Barbosa, F. A. R., Bueno, D. C., Curi Pedrosa, R., Canto, R. F. S., Colle, D., . . . Farina, M. (2021). Prevention of ferroptosis in acute scenarios: an in vitro study with classic and novel anti-ferroptotic compounds. *Free Radical Research*, 55(11-12), 1062-1079. <https://doi.org/10.1080/10715762.2021.2017912>
- Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427-434. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>
- Percie du Sert, N., Alfieri, A., Allan, S. M., Carswell, H. V. O., Deuchar, G. A., Farr, T. D., . . . Macrae, I. M. (2017). The IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments). *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(11), 3488-3517. <https://doi.org/10.1177/0271678X17709185>
- Ploughman, M., Windle, V., MacLellan, C. L., White, N., Doré, J. J., & Corbett, D. (2009). Brain-Derived Neurotrophic Factor Contributes to Recovery of Skilled Reaching After Focal Ischemia in Rats. *Stroke*, 40(4), 1490-1495. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531806>
- Powers, W. J. (2020). Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine*, 383(3), 252-260. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1917030>
- Quispe, R. L., Canto, R. F. S., Jaramillo, M. L., Barbosa, F. A. R., Braga, A. L., de Bem, A. F., & Farina, M. (2018). Design, Synthesis, and In Vitro Evaluation of a Novel Probucol Derivative: Protective Activity in Neuronal Cells Through GPx Upregulation [journal article]. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0939-6>
- Rewell, S. S. J., Churilov, L., Sidon, T. K., Aleksoska, E., Cox, S. F., Macleod, M. R., & Howells, D. W. (2017). Evolution of ischemic damage and behavioral deficit over 6 months after MCAo in the rat: Selecting the optimal outcomes and statistical power for multi-centre preclinical trials. *PLOS ONE*, 12(2), e0171688-e0171688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171688>
- Ribeiro, R. P., Moreira, E. L. G., Santos, D. B., Colle, D., dos Santos, A. A., Peres, K. C., . . . Farina, M. (2013). Probucol Affords Neuroprotection in a 6-OHDA Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neurochemical Research*, 38(3), 660-668. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0965-0>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1(3), 1458-1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Santos, D. B., Colle, D., Moreira, E. L. G., Hort, M. A., Godoi, M., Le Douaron, G., . . . Farina, M. (2017). Succinobucol, a Non-Statins Hypocholesterolemic Drug, Prevents Premotor Symptoms and Nigrostriatal Neurodegeneration in an Experimental Model of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, 54(2), 1513-1530. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9747-z>

- Santos, D. B., Peres, K. C., Ribeiro, R. P., Colle, D., Santos, A. A. d., Moreira, E. L. G., . . . Farina, M. (2012). Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. *Experimental Neurology*, *233*(2), 767-775. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.036>
- Schaar, K. L., Breneman, M. M., & Savitz, S. I. (2010). Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & translational stroke medicine*, *2*(1), 13-13. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-13>
- Selvaraj, B., Nguyen, U. T. T., Huh, G., Nguyen, D. H., Mok, I.-K., Lee, H., . . . Lee, J. W. (2020). Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives as neuroprotective agents against glutamate-induced HT22 mouse hippocampal neuronal cell death. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *30*(22), 127597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127597>
- Shen, X.-Y., Gao, Z.-K., Han, Y., Yuan, M., Guo, Y.-S., & Bi, X. (2021). Activation and Role of Astrocytes in Ischemic Stroke [Review]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.755955>
- Sorby-Adams, A. J., Leonard, A. V., Hoving, J. W., Yassi, N., Vink, R., Wells, A. J., Turner, R.J. (2019). NK1-r Antagonist Treatment Comparable to Decompressive Craniectomy in Reducing Intracranial Pressure Following Stroke. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 681. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00681>
- Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., . . . Mogil, J. S. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*, *7*, 55. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55>
- Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., . . . Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, *171*(2), 273-285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>
- Tang, D., Chen, X., Kang, R., & Kroemer, G. (2020). Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00441-1>
- Tardif, J.-C., Grégoire, J., Schwartz, L., Title, L., Laramée, L., Reeves, F., . . . Guertin, M.-C. (2003). Effects of AGI-1067 and Probucol After Percutaneous Coronary Interventions. *Circulation*, *107*(4), 552-558. <https://doi.org/doi:10.1161/01.CIR.0000047525.58618.3C>
- Tardif, J.-C., McMurray, J. J. V., Klug, E., Small, R., Schumi, J., Choi, J., . . . Pfeffer, M. A. (2008). Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, *371*(9626), 1761-1768. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60763-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60763-1)
- Tobaben, S., Grohm, J., Seiler, A., Conrad, M., Plesnila, N., & Culmsee, C. (2011). Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death & Differentiation*, *18*(2), 282-292. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.92>
- Towfighi, A., Ovbiagele, B., Hussein, N. E., Hackett, M. L., Jorge, R. E., Kissela, B. M., . . . Williams, L. S. (2017). Poststroke Depression: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, *48*(2), e30-e43. <https://doi.org/doi:10.1161/STR.0000000000000113>
- Tymianski, M. (2011). Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. *Nature Neuroscience*, *14*(11), 1369-1373. <https://doi.org/10.1038/nn.2951>

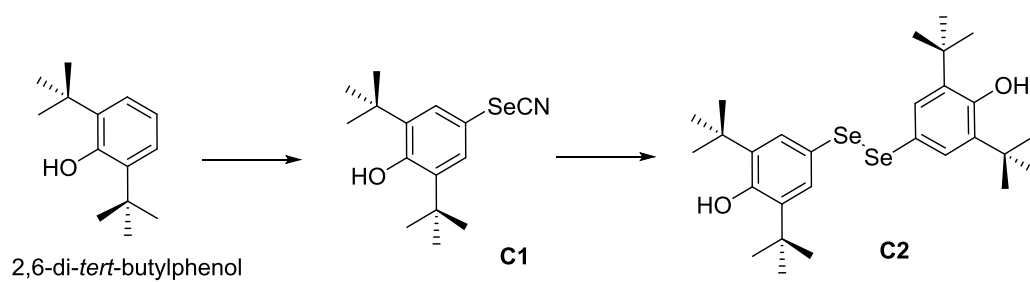
- Wenz, C., Faust, D., Linz, B., Turmann, C., Nikolova, T., Bertin, J., . . . Dietrich, C. (2018). t-BuOOH induces ferroptosis in human and murine cell lines. *Archives of Toxicology*, *92*(2), 759-775. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2066-y>
- Windle, V., Szymanska, A., Granter-Button, S., White, C., Buist, R., Peeling, J., & Corbett, D. (2006). An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Experimental Neurology*, *201*(2), 324-334. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.04.012>
- Xu, Y., Li, K., Zhao, Y., Zhou, L., Liu, Y., & Zhao, J. (2022). Role of Ferroptosis in Stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01196-6>
- Yaghi, S., Willey, J. Z., Cucchiara, B., Goldstein, J. N., Gonzales, N. R., Khatri, P., . . . Schwamm, L. H. (2017). Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, *48*(12), e343-e361. <https://doi.org/doi:10.1161/STR.0000000000000152>
- Yamashita, S., Masuda, D., & Matsuzawa, Y. (2015). Did we abandon probucol too soon? *Curr Opin Lipidol*, *26*(4), 304-316. <https://doi.org/10.1097/mol.0000000000000199>
- Yan, H.-f., Zou, T., Tuo, Q.-z., Xu, S., Li, H., Belaidi, A. A., & Lei, P. (2021). Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 49. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00428-9>
- Yoo, S.-J., Cho, B., Lee, D., Son, G., Lee, Y.-B., Soo Han, H., . . . Moon, C. (2017). The erythropoietin-derived peptide MK-X and erythropoietin have neuroprotective effects against ischemic brain damage. *Cell Death & Disease*, *8*(8), e3003-e3003. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.381>

Supporting Information

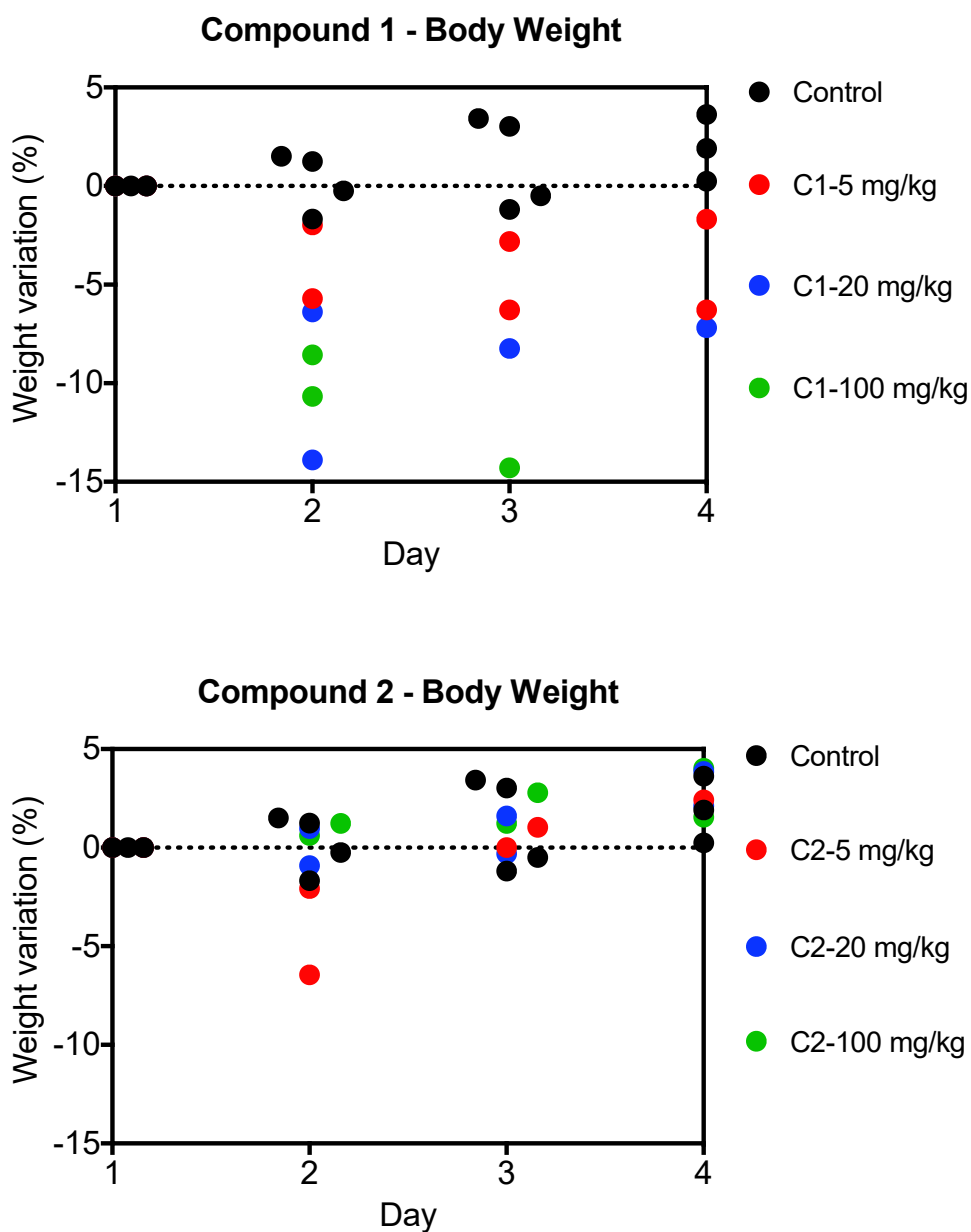
Supplemental Table 1: Chemicals, reagents and antibodies used in the study.

Chemicals/reagents	Supplier	Code
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich	D9 132
2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH ₂ -DA)	Sigma-Aldrich	358 45
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	M2 128
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)	Sigma-Aldrich	D8 130
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox™)	Sigma-Aldrich	238 813
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Thermo Fisher	152 40062
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	472 301; D2650
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Thermo Fisher	121 00046
Endothelin-1	Sigma-Aldrich	E7 764
Fetal bovine serum (FBS)	Thermo Fisher	161 40071
Glutathione reductase (GR) from baker's yeast	Sigma-Aldrich	G3 664
Hanks' Balanced Salt solution	Sigma-	H8

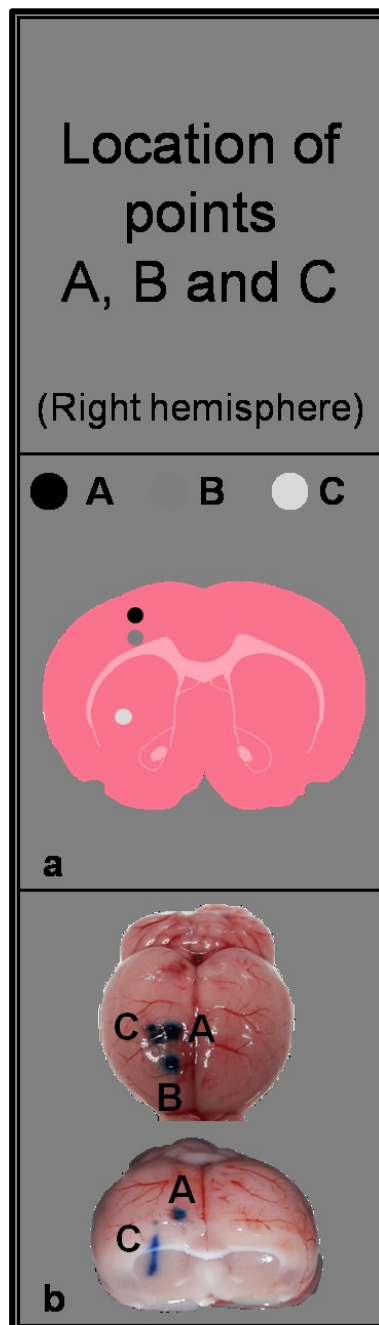
(HBSS)	Aldrich	264	
L-Glutamic acid	Sigma- Aldrich	251	G1
L-Glutathione reduced	Sigma- Aldrich	251	G4
Probucol	Sigma- Aldrich	672	P9
Propidium iodide (PI)	Sigma- Aldrich	170	P4
<i>tert-Butyl hydroperoxide</i> (t-BuOOH)	Sigma- Aldrich	139	458
Triton X-100	Sigma- Aldrich	00	X1
Trypsin-EDTA	Therm o Fisher	00054	154
β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced tetra(cyclohexylammonium) salt (NADPH)	Sigma- Aldrich	130	N5
Antibodies/reagents	Suppli er	Co de/RRID	
Anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP) rabbit polyclonal	Sigma- Aldrich	269/ AB_477035	G9
Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Peroxidase Conjugated	Sigma- Aldrich	132P/ AB_90264	AP
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride	Sigma- Aldrich	905	D5



Supplemental Figure 1: New probucol analogues (Compounds 1 and 2). In addition to the chemical structures, a brief scheme of the synthetic pathway is provided. **C1** was synthesized from 2,6-di-*tert*-butylphenol and **C2** was synthesized from **C1**. Details on the synthesis are provided in the Methods Section.



Supplemental Figure 2: Preliminary toxicological evaluation. Toxicity was evaluated based on the mortality rate and body weight loss. Animals received i.p. injections of the compounds once a day for four days. Both graphics depict the animals' body weight during the toxicological study. Experimental number per group was 2 ($n = 2$), except for control group ($n = 4$; same for *C1* and *C2*). Each circle represents an individual. *C1*, at the highest dose (100 mg/kg; green circle), caused a first death on day 3 and a second death on day 4, representing a mortality rate of 100% on day 4. After euthanasia, a macroscopic evaluation of the main organs (brain, liver, kidney, hearth, lungs) showed an evident hepatic steatosis in animals treated with *C1*. No macroscopic changes and general toxic effects were observed in animals treated with *C2*.



Supplemental Figure 3: Stereotaxic injection sites of ET-1. (a) Schematic representation of the ET-1 injection sites. (b) Image of a representative rat brain showing the actual locations of ET-1 (methylene blue was used as dye).

Sample size calculation details

Sample size calculation was performed based on a primary (small) experimental set of animals, whose results were posteriorly added to the main study (composed of 4 experimental sets; detailed in the Supplemental Table 2).

Supplemental Table 2: Subjects number and experimental sets.

Animal sets	Subjects number (before surgery)	Survival rate (%)	Subjects number (after surgery)
<i>1st</i>	<i>17</i>	<i>82.35</i>	<i>14</i>
2nd	17	76.47	13
3rd	17	82.35	14
4th	20	80	16
Total	71	~ 80	57

A total of 71 rats were used in the focal ischemia protocol. Because of a mortality rate of ~20%, 57 animals were evaluated in the behavioural and histological analyses. The first set involved 14 animals that survived post-surgery; these animals were used to perform sample size calculations.

For sample size calculation, we initially evaluated the performance of the animals ($n = 14$) in the cylinder test, which has been reported as a valuable tool to assess central unilateral damage (Schaar, Brenneman et al. 2010). Sample size calculation was performed using the Statistica software, version 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2008). Considering a goal power = 0.8 and $\alpha = 0.05$, the sample size calculation indicated the need for (i) a minimum experimental number of 9 animals per group for ET-1 effect and (ii) a minimum experimental number of 5 animals per group for the interaction effect.

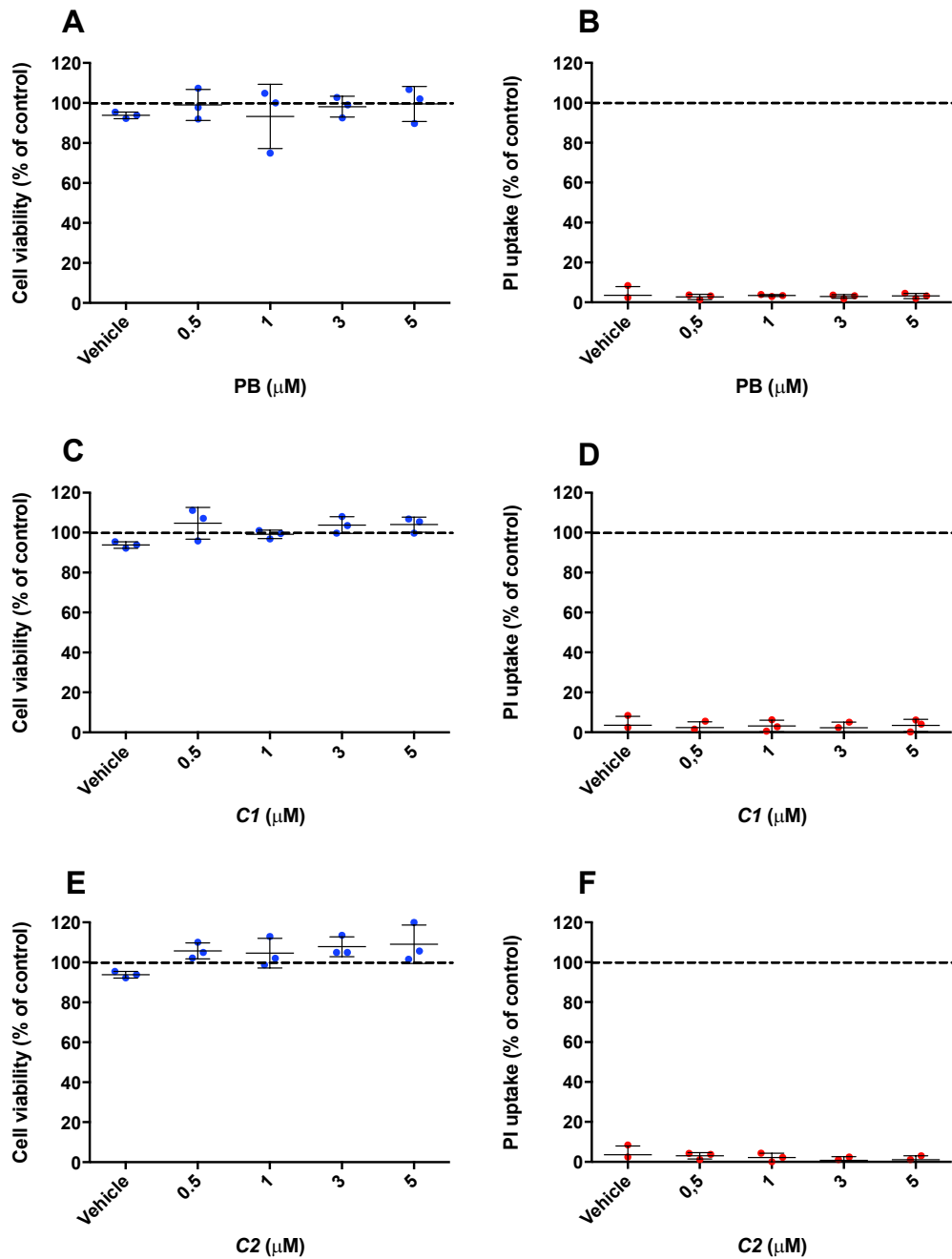
The experimental number of 9 animals per group was selected; however, considering possible animal losses during surgery and/or treatments in the following 3 additional experimental sets, we initially decided to increase this number to up to 11. We indeed had a significant mortality (~20%) in the surgical and/or early postsurgical periods (detailed below). Considering such losses and the fact that the most relevant groups [(i) control; (ii) ET-1 and

(iii) ET-1 + RC 50 mg/kg C2] were prioritized when allocating animals in the three last experimental sets, their experimental number was kept at eleven (N = 11), detailed in the Supplemental Table 3 (below).

Supplemental Table 3: Experimental number per group at the end of the study.

Experimental set →	First	Second	Third	Fourth	TOTAL
Groups ↓					
Control	3 (3)	3 (2)	3 (3)	3 (3)	12 (11)
ET-1	3 (2)	4 (3)	4 (3)	3 (3)	14 (11)
Compound 2 (20)	2 (1)	2 (1)	2 (2)	4 (2)	10 (6)
Compound 2 (50)	3 (3)	2 (1)	2 (2)	3 (2)	10 (8)
ET-1 + Compound 2 (20)	3 (3)	3 (3)	2 (1)	4 (3)	12 (10)
ET-1 + Compound 2 (50)	3 (2)	3 (3)	4 (3)	3 (3)	13 (11)
TOTAL	17 (14)	17 (13)	17 (14)	20 (16)	71 (57)

Although we started with 71 animals for the focal ischemia protocol, 57 animals were evaluated in the behavioural and histological analyses due to a mortality rate of approximately 20%. The numbers between parentheses indicate the actual experimental number after animal losses.



Supplemental Figure 4: Probucol and its analogues have no cytotoxic effects in HT22 cells. Cells were seeded into 96-well plates at a density of 9.0×10^3 cells/cm³. After 24 h, cells were incubated with 0.05% ethanol (used as a vehicle), 0.5, 1, 3 and 5 μM of probucol, C1 or C2. After 48 h, metabolic cell viability (A, C and E) was evaluated by the MTT assay. Cell death (B, D and F) was evaluated by propidium iodide (PI) uptake. Probucol (PB) and analogues (C1 and C2) did not significantly change metabolic cell viability and cell death. Cell viability is expressed as percentage of control (untreated cells, 100%, dashed line). Cell death is expressed as percentage of the positive control (cells treated with 2% Triton X-100, 100%, dashed line). Data are presented as mean \pm SD. Three independent experiments were performed ($n = 3$) and each dot represents the average of 3 technical replicates.

APÊNDICE C – Manuscrito 2**LPS-activated microglial cell-derived conditioned medium protects HT22 neuronal cells
against glutamate-induced ferroptosis**

Mauricio Tavares Jacques^{1*}, Marcelo Farina^{1*}

¹ Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

* Corresponding authors: marcelo.farina@ufsc.br and mtjacques9@gmail.com. Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Zip Code: 88040-900. Santa Catarina, Brazil.

ABSTRACT

The mammalian brain homeostasis is maintained by a complex arrangement of heterogeneous cell types that orchestrate metabolism and neurotransmission. Such balance is commonly disturbed in brain pathological conditions such as Parkinson's and Alzheimer's diseases, which have neuroinflammation and oxidative stress as pivotal mechanisms, being the last recently linked to a new oxidative form of cell death called ferroptosis. Microglia are one of the key support cells in the brain that respond to disruptions in such homeostasis. Its participation in neuroinflammation is well-known, however, studies investigating the role of these cells within a ferroptotic context are lacking. To address this issue, we explored whether microglial (BV-2 cells) activation products can intensify, mitigate or block oxidative and/or ferroptotic damage in neuronal cells (HT22 cell line). Cultured BV-2 microglial cells were stimulated with 5 - 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) for 24 h and, after confirmation of microglial activation, their culture medium (conditioned media; CM) was transferred to neuronal cells, which was subsequently (6 h later) exposed to glutamate or *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH). As major finding, HT22 cells pretreated for 6 h with CM exhibited a significant ferroptosis-resistant phenotype characterized by decreased sensitivity to glutamate (15 mM)-induced cytotoxicity. However, no significant protective effects of LPS-activated microglial cell-derived CM were observed in *t*-BuOOH (30 μ M)-challenged cells. These results indicate that activated microglia-derived molecules may protect neuronal cells against ferroptosis. The phenomenon observed in this work highlights the beneficial relationship between microglia and neuron, showing new therapeutic approaches for the control of ferroptotic cell death.

Keywords: BV-2, HT22, conditioned media, glutamate, *tert*-butyl hydroperoxide, ferroptosis.

1. INTRODUCTION

The brain exhibits a high requirement for oxidative metabolism. Indeed, approximately 20% of the oxygen used by the human body at rest are designated to cerebral functions [1]. Such high oxygen consumption leads, consequently, to a higher production of oxygen-derived reactive and oxidant species, which, summed to a modest brain's antioxidant defenses, render this organ highly susceptible to oxidative stress [2]. Of particular importance, neurons exhibit higher rate of oxidative metabolism [3] and lower antioxidant capacity [4] compared to glial cells, which make this cell type highly prone to oxidation. Additionally, neuronal membranes can be composed of polyunsaturated fatty acids (PUFA), which are sensitive to the action of oxidants [5]. In this scenario, neurons are highly susceptible to oxidative damage and degeneration, which seems to play pivotal roles in the development of neurodegenerative diseases such as Parkinson's, Alzheimer's and amyotrophic lateral sclerosis [5-8]. Among the pathophysiological events underpinning the development of such neurodegenerative diseases excitatory amino acid toxicity, impaired energy metabolism and oxidative stress represents major events [9]. Of particular importance, a recent form of nonapoptotic programmed cell death called ferroptosis has emerged as a pathway of interest in the aforementioned context [10].

Ferroptosis, a recently described form of regulated nonapoptotic cell death, is characterized by loss of control over iron metabolism, thiol regulation and lipid peroxidation [11]. It also has hallmarks such as glutathione (GSH) depletion, glutathione peroxidase 4 (GPX4) disruption, increased levels of reactive oxygen species (ROS) and intense lipid peroxidation [12]. Interestingly, features present in ferroptosis, such as GSH depletion, lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and Ca^{2+} dysregulation, are also present in aging, Alzheimer's and Parkinson's diseases, amyotrophic lateral sclerosis and stroke, suggesting a possible participation of this pathway in these conditions [13]. Therefore, mitigating or blocking ferroptosis in neurons (and brain environment) becomes a plausible therapeutic target of interest. This possibility can be supported by different approaches, which aim, for example, to reduce local oxidative stress by supporting antioxidant defenses or acting directly on reactive species. Despite the well-known supportive metabolic and antioxidant roles of astrocytes toward neurons [14], studies on the relationship between glial cells (including microglia) and neurons in the ferroptotic context are absent.

Microglia are immune cells resident in the central nervous system, described as double-edged swords, as they have protective or damaging aspects, improving or aggravating the physiological or pathological condition in which they act [15]. The dysregulation of the sentinel, housekeeping and defense functions of the microglia is associated with neuronal damage in diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's and stroke [15, 16]. Although an "activated" microglia is capable of releasing numerous factors that can damage neurons, we cannot disregard the possible protective role of these signals since there is a complex cross-talk between microglia and neurons and the result of these interactions could be beneficial in certain conditions [17-19]. However, as already mentioned, studies on the relationship between microglial cells and neurons in the ferroptotic context are lacking.

Considering that (i) neurons are particularly sensitive to oxidative damage, (ii) ferroptosis seems to play a significant role in neurodegenerative conditions, and (iii) microglial cells (mainly when activated) produce a variety of molecules capable of directly and indirectly affect neurons, we investigated whether the conditioned media of cultured microglia stimulated with lipopolysaccharide (LPS, a classic microglial stimulator) would be able to provide modulatory (protective or deleterious) effects in neuronal cells (HT22 cell line) challenged by models of oxidative toxicity - glutamate-induced ferroptosis and *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH)-mediated oxidative damage. We observed that the conditioned medium derived from LPS-stimulated microglia prevented glutamate- (but not *t*-BuOOH) induced cytotoxicity. This observation show the protective effects of microglia-derived molecules against neuronal ferroptosis, shedding light to a new event related to the well-known beneficial relationship between neuronal and glial cells.

2. MATERIALS E METHODS

2.1. Chemicals/reagents

Information concerning the chemicals/reagents used in this work is present in Supplemental Table 1, which depicts suppliers and the product codes.

2.2. Cell cultures

The neuronal HT22 cell line was kindly provided by Dr. David Schubert (Salk Institute, La Jolla, CA, USA) and the microglial BV-2 cell line was gently provided by Professor Licio Augusto Velloso (Universidade Estadual de Campinas, Brazil). The HT22 (mouse hippocampal neurons) and BV-2 (mouse-derived microglia) cell lines were grown in Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL) and glutamine (2 mM) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were grown until they are 80–90% confluent and used between the 3rd and 12th passages. All experiments were performed in 96-well plates.

2.3. Production of conditioned media and nitric oxide assay

BV-2 cells were stimulated with different concentrations of LPS, ranging from 5 to 100 ng/mL, in 96-well plates for 24 h. In order to confirm that such concentrations of LPS were sufficient to induce microglial activation in BV-2 cells, and thus producing a conditioned media (CM), nitric oxide (NO) production was estimated by the measurement of nitrite using the Griess method [20]. Briefly, after 24 h stimulation with LPS, the supernatant of the BV-2 cell culture media was collected and mixed with Griess reagent (0.1% N-1-naphthylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 1% phosphoric acid), after 10 min incubation at room temperature the result was analyzed at 543 nm (Tecan Infinite M200).

2.4. Glutamate and *t*-BuOOH exposure paradigm in HT22 cells

In order to investigate whether the CM produced by LPS-stimulated BV-2 cells (item 2.3) would be able to induce a beneficial effect in oxidative scenarios, HT22 cells were exposed to glutamate and *t*-BuOOH, which were reported to cause oxidative stress, especially glutamate used in ferroptosis models [21, 22]. Of note, glutamate is a well-established inducer of ferroptosis [11, 23], while *t*-BuOOH can induce different types of cell death, such as necrosis, apoptosis and necroptosis [24-29]. HT22 cells were exposed to different concentrations of glutamate (1 - 20 mM) or *t*-BuOOH (5 - 100 µM) in 96-well plates for 24 h. After this period, the induction of toxicity was verified by metabolic viability and cell death (items 2.6 e 2.7).

2.5. CM exposure paradigm in HT22 cells

HT22 cells were exposed to CM obtained according to item 2.3. Of note, all CM produced was only used in HT22 cells after confirmation of microglial activation (nitrite production) in most groups. Briefly, HT22 cells were seeded in 96-well plates for 24 h, then half (50 μ L) of their culture medium was removed and replaced with 50 μ L of CM for 6 h. After this period, HT22 cells were exposed for 18 h to 15 mM glutamate or 30 μ M t-BuOOH.

2.6. Cell metabolic viability assay

The metabolic cell viability of HT22 and BV-2 cells was evaluated through their ability to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), which was quantified as described previously [30]. After the cells were exposed to LPS, CM, glutamate or t-BuOOH in 96-well plates, their culture medium was removed and an MTT solution was added, followed by 1 h incubation at 37°C. Afterwards, the wells were emptied and the formazan product was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and the results were quantified at 540 nm (Tecan Infinite M200).

2.7. Cell death assay

Cell death assay was performed based on the incorporation and binding of propidium iodide (PI) to the DNA, producing red fluorescence in cells with damaged plasma membranes [31]. After the cells were exposed to LPS, CM, glutamate or t-BuOOH in 96-well plates, 147 μ g/mL propidium iodide (PI) was added to the cells, and then incubated for 20 min at 37°C in the dark. Fluorescence was quantified at 535 nm excitation and 617 nm emission (Tecan Infinite M200).

2.8. Statistical analysis

Initially, Grubbs' test, also called the ESD method (extreme studentized deviate), was performed to detect and exclude significant outliers. Data were subjected to D'Agostino & Pearson's normality test. *In vitro* data were analysed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. Graphics and ANOVAs were

performed using the Graph-Pad PRISM® software version 7.0a (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results were expressed as mean \pm SD and significance was considered when $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 LPS is not cytotoxic and induces microglial activation

BV-2 microglial cells were responsive to different concentrations of LPS, with significant increased production of nitrite from 40 ng/mL of LPS (Fig. 1A). Nitrite is a stable end-product of nitric oxide (NO) metabolism, being used as a proxy to indicate microglial activation [32]. The concentrations of LPS used, which were able to stimulate BV-2 cells, did not cause significant changes in cell viability (Fig. 1B and C) and therefore were used in this work as a standardized approach to obtain the conditioned media (CM).

3.2 LPS and CM were not cytotoxic in HT22 cells

In order to initially discard potential neurotoxic effects of LPS and/or CM derived from LPS-stimulated BV-2 cells, the cultured HT22 cells were exposed to both potential challenges. We found that HT22 cells viability was not compromised by LPS (Fig. 2A and B) or by the CM derived from LPS-activated BV-2 cells (Fig. 2C and D). From a methodological and experimental point of view, these results were necessary to discard the occurrence of direct cytotoxic effects of LPS and/or LPS-derived CM in HT22 cells and further explore the potential beneficial effects of such CM in this neuronal cell line.

3.3 Glutamate and *t*-BuOOH induced a concentration-dependent cytotoxicity in HT22 cells

After establishing that CM derived from LPS-stimulated BV-2 cells did not cause significant negative effects on HT22 cells viability, we investigated whether this CM would have any beneficial potential within oxidative scenarios, including a ferroptotic model. To fulfill this objective, we first investigated the effects of glutamate and *t*-BuOOH on cell viability. Of note, glutamate and *t*-BuOOH have been reported to cause oxidative stress and,

in particular, the use of glutamate is a well-established ferroptosis model [11, 21, 22]. Additionally, *t*-BuOOH can cause several types of cell death, such as necrosis, apoptosis, necroptosis and parthanatos [24-29]. Significant concentration-dependent declines in HT22 cells viability were observed after both glutamate (Fig. 3A and B) and *t*-BuOOH (Fig. 3C and D) paradigms. The concentrations of 15 mM glutamate and 30 μ M *t*-BuOOH were used, which induced a loss of approximately 50% in the HT22 cell viability after a 24 h treatment, were used in the following studies (item 3.4).

3.4 CM derived from LPS-stimulated microglial cells protected against glutamate-induced ferroptosis, but not against the oxidative toxicity induced by *t*-BuOOH in HT22 cells

Finally, we evaluated whether the CM derived from LPS-stimulated microglial cells, which has been reported to be rich in (immuno)modulatory mediators [20, 33, 34], could modulate the oxidative damage induced by both glutamate and *t*-BuOOH in HT22 cells. For this purpose, we pretreated HT22 cells with the CM derived from LPS-stimulated BV-2 cells for 6 h and then exposed these cells to 15 mM glutamate and 30 μ M *t*-BuOOH; these concentrations are capable of inducing approximately 50% loss in cell viability. Of note, HT22 cells pretreated for 6 h with the CM derived from LPS-stimulated BV-2 cells were protected against glutamate-induced ferroptosis (Fig. 4A and B), although no significant protection was observed against 30 μ M *t*-BuOOH (Fig. 4C and D). As seen in Fig. 4 (A and B), stimuli from 10 to 100 ng/mL of LPS were able to generate a CM that protected HT22 cells only against glutamate-induced cytotoxicity, pointing to a specificity of such protection in a ferroptosis context.

4. DISCUSSION

Most of the available scientific literature points to a binary classification of microglial activation, assuming two opposite cell states characterized by a pro-inflammatory (M1) or an anti-inflammatory (M2) profile [35]. Although some lines of evidence indicate that such opposite and polarized states do not represent certain (patho)physiological conditions in the brain [36, 37], the M1/M2 nomenclature is commonly accepted and used (including in this manuscript). LPS is a classic inducer of the M1 microglial state, which is

usually associated with deleterious effects in neuropathological conditions; the M2 microglial state being desirable [38]. However, our results demonstrated that molecules present in the conditioned medium (CM) derived from a classic M1 microglial activation were able to afford a ferroptosis-resistant phenotype in neurons, indicating that the M1 state are not necessarily linked to neurotoxicity. Conversely, our results indicate that controlled microglial activation towards the M1 state may be beneficial, at least in some specific scenarios. Given the relevance of ferroptosis in neurodegenerative disorders [39], our results represent a relevant finding.

Activated microglia can release a wide range of substances; BV-2 cells treated with 100 ng/mL LPS for 24 h (same concentration/time stimulus used in our work) had a significant increase in NO production and mRNA expression of IL-6, IL-1 β , TNF- α , and iNOS [40, 41]. Of note, a significant increase in TNF- α and IL-6 in CM was also induced with 100 ng/mL LPS in BV-2 cells [20]. Our data suggest that the stimulation caused by these substances mentioned and others derived from microglial activation can induce beneficial effects in neurons. In agreement with our findings, one study reported that the CM derived from LPS-treated mouse-primary microglia presented higher levels of TNF- α , IL-6 and NO and that such CM was able to increase the survival of midbrain dopaminergic neurons [42]. Of particular importance, this study showed that the physical presence of glial cells is necessary for the induction of neurotoxicity, by comparing neuron-enriched (low percentage of astrocytes and microglia) and neuron-glia cultures (high percentage of astrocytes and microglia, and similar to *in vivo* conditions) exposed to 1 μ g/ml LPS [42]. This observation supports our hypothesis that microglial activation towards M1 is not necessarily deleterious, and suggests that the negative effects attributed to the M1 state may be the result of the complex interaction between glial cells and neurons. Indirectly, this report provides an arguable reason for the low toxicity of CM on HT22 cells observed in our work.

Within a pathological and neurodegenerative scenario characterized by chronic microglial activation, there is an undeniable injurious role for pro-inflammatory mediators released by microglia [15]. However, it is reasonable to argue that under certain conditions the products of M1 microglial activation may be neuroprotective. For example, TNF- α (100 ng/mL) protected cortical neuronal cultures against injury induced by glutamate, N-methyl-d-aspartic acid (NMDA) and deprivation of glucose [43, 44]. Similarly, neurons pretreated with IL-1 β (25 ng/mL) exhibited resistance against NMDA-induced cytotoxicity [44]. Finally, SH-SY5Y neuroblastoma cells treated with IL-6 (from 0.025 to 25 ng/mL)

resisted the oxidative damage caused by hydrogen peroxide [45]. In addition, IL-6 (10 ng/mL) protected against neurotoxicity induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) in dopaminergic neurons [46]. Even though we detected a significant protective effect of LPS-activated BV2 cell-derived conditioned medium in a ferroptosis model - based on the exposure to high (milimolar) concentrations of glutamate in HT22 cells - it is reasonable to hypothesize that the occurrence of such event is less probable in cells expressing NMDA receptors, such as cultured primary neurons, which undergo excitotoxicity at low (micromolar) glutamate concentrations [47-49]. Furthermore, we must not exclude the possibility that a substance of a non-peptide or non-protein nature contributes to the neuroprotective effects. Corroborating this hypothesis, a study reported that the inactivation of proteins by heat and by peptidases/proteases was not able to fully inhibit the protective effect of CM [50]. In this scenario, our study is the first to show that the CM derived from LPS-activated microglial cells has protective effects against ferroptosis in neuronal cells.

Finally, we need to explore the hypotheses for the contrasting effects induced by CM against an oxidative (*t*-BuOOH) and a ferroptotic (glutamate) damage. The pathways by which *t*-BuOOH causes oxidative damage are not fully understood in HT22 cells. It is reported that HT22 cells exposed to 40, 70 or 100 μ M *t*-BuOOH exhibit mitochondrial dysfunction and superoxide anion generation [51]. *t*-BuOOH induced necrotic cell death in murine fibroblasts (NIH3T3) and human keratinocytes (HaCaT), an increase in lipid peroxidation and cytosolic ROS sensitive to ferrostatin-1 and liproxstatin-1 was observed [52]. Interestingly, ferroptosis was performed independently of other *t*-BuOOH-induced damage, such as loss of mitochondrial membrane potential and DNA double-strand breaks, thus indicating the participation of cell death type(s) other(s) than ferroptosis [52]. A study with Neuro-2a (mouse neuroblastoma) and SH-SY5Y (human neuroblastoma) demonstrated that treatment with *t*-BuOOH was able to induce cell death via apoptosis [53]. Although ferroptosis has also been reported as a potential type of cell death after *t*-BuOOH exposure - at least in some specific cell types, such as PC12 cells [54] - it is well known that necrosis, apoptosis, necroptosis and parthanatos also represent events resulting from *t*-BuOOH exposure [24-29]. Despite glutamate is a classic inducer of excitotoxic cell death in neurons [55, 56], such event is only possible in glutamate N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor-containing cells [57]. In fact, the lack of NMDA-receptors in HT22 cells renders such cell line a classic tool to investigate glutamate-induced ferroptosis/oxytosis [58], which is linked to the depletion of glutathione due to the decreased uptake of cystine via the xCT system [39]. Even

though our protocols were based on similar intensities of deleterious challenges (approximately a 40% reduction in cell viability after exposures to 15 mM glutamate or 30 μ M *t*-BuOOH), the protective effect of activated BV2 cells-derived CM was observed only in the glutamate-based model, pointing to a potential specificity of the protection against ferroptotic challenges.

In summary, our results show that substances derived from M1 microglial activation are not necessarily toxic, adding evidence to the debate against the dichotomous classification with pre-established functions for M1 and M2 (neurotoxic and neuroprotective, respectively). Taken together, our data reveal an unexplored therapeutic possibility, i.e., the modulation of ferroptosis through microglial activation products, shedding light on a new event related to beneficial communication between neurons and microglia.

Statements and Declarations

Authors' contributions: MF conceived and implemented the project. MF and MTJ planned and designed the experiments. MTJ performed the experiments. MF and MTJ wrote and edited the manuscript.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Data Availability statement: The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Funding: The research grants 302952/2018-7 and 404666/2018-3, afforded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) to Farina M, are specially acknowledged.

Acknowledgements: Jacques MT thanks the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) for a doctoral scholarship. We are grateful to the Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia at the Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/UFSC) for providing its infrastructure for carrying out biochemical analysis. The authors also thank Professor Licio Augusto Velloso (Universidade Estadual de Campinas, Brazil) for gently providing the BV-2 cells.

REFERENCES

1. Magistretti Pierre J and Allaman I (2015) A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron* 86:883-901. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.035
2. Lee KH, Cha M and Lee BH (2020) Neuroprotective Effect of Antioxidants in the Brain. *International journal of molecular sciences* 21:7152. doi: 10.3390/ijms21197152
3. Bélanger M, Allaman I and Magistretti Pierre J (2011) Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metabolism* 14:724-738. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016
4. Bolaños JP (2016) Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *Journal of Neurochemistry* 139:115-125. doi: <https://doi.org/10.1111/jnc.13486>
5. Singh A, Kukreti R, Saso L and Kukreti S (2019) Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24:1583.
6. Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA and Ganie SA (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 74:101-110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>
7. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M and Brown GC (2018) Neuronal Cell Death. *Physiological Reviews* 98:813-880. doi: 10.1152/physrev.00011.2017
8. Moujalled D, Strasser A and Liddell JR (2021) Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death & Differentiation* 28:2029-2044. doi: 10.1038/s41418-021-00814-y
9. Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J and Filip M (2016) Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* 53:4094-4125. doi: 10.1007/s12035-015-9337-5
10. Reichert CO, de Freitas FA, Sampaio-Silva J, Rokita-Rosa L, Barros PdL, Levy D and Bydlowski SP (2020) Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. *International journal of molecular sciences* 21:8765. doi: 10.3390/ijms21228765
11. Dixon Scott J, Lemberg Kathryn M, Lamprecht Michael R, Skouta R, Zaitsev Eleina M, Gleason Caroline E, Patel Darpan N, Bauer Andras J, Cantley Alexandra M, Yang Wan S, Morrison B, III and Stockwell Brent R (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* 149:1060-1072. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042

12. Jiang X, Stockwell BR and Conrad M (2021) Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22:266-282. doi: 10.1038/s41580-020-00324-8
13. Maher P, Currais A and Schubert D (2020) Using the Oxytosis/Ferroptosis Pathway to Understand and Treat Age-Associated Neurodegenerative Diseases. *Cell Chemical Biology* 27:1456-1471. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.10.010
14. Baxter PS and Hardingham GE (2016) Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 100:147-152. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.027>
15. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L and El Khoury J (2018) Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience* 21:1359-1369. doi: 10.1038/s41593-018-0242-x
16. Iizumi T, Takahashi S, Mashima K, Minami K, Izawa Y, Abe T, Hishiki T, Suematsu M, Kajimura M and Suzuki N (2016) A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. *Journal of Neuroinflammation* 13:99. doi: 10.1186/s12974-016-0564-0
17. Hellwig S, Heinrich A and Biber K (2013) The brain's best friend: microglial neurotoxicity revisited. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00071
18. Chen Z and Trapp BD (2016) Microglia and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry* 136:10-17. doi: <https://doi.org/10.1111/jnc.13062>
19. Szepesi Z, Manouchehrian O, Bachiller S and Deierborg T (2018) Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00323
20. Cho N, Moon EH, Kim HW, Hong J, Beutler JA and Sung SH (2016) Inhibition of Nitric Oxide Production in BV2 Microglial Cells by Triterpenes from *Tetrapanax papyriferus*. *Molecules (Basel, Switzerland)* 21:459-459. doi: 10.3390/molecules21040459
21. Bueno DC, Canto RFS, de Souza V, Andreguetti RR, Barbosa FAR, Naime AA, Dey PN, Wüllner V, Lopes MW, Braga AL, Methner A and Farina M (2020) New Probucol Analogues Inhibit Ferroptosis, Improve Mitochondrial Parameters, and Induce Glutathione Peroxidase in HT22 Cells. *Molecular Neurobiology* 57:3273-3290. doi: 10.1007/s12035-020-01956-9
22. Kučera O, Endlicher R, Roušar T, Lotková H, Garnol T, Drahotka Z and Červinková Z (2014) The Effect of *tert*-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes *In Vitro*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014:752506. doi: 10.1155/2014/752506

23. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascón S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA and Zhang DD (2017) Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* 171:273-285. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021
24. Zhao W, Feng H, Sun W, Liu K, Lu J-J and Chen X (2017) Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: Roles of NOX4 and mitochondrion. *Redox biology* 11:524-534. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.036
25. Pias EK and Aw TY (2002) Early redox imbalance mediates hydroperoxide-induced apoptosis in mitotic competent undifferentiated PC-12 cells. *Cell Death & Differentiation* 9:1007-1016. doi: 10.1038/sj.cdd.4401064
26. Kim SC, Lee JR and Park SJ (2014) Role of 6-Shogaol in *Tert*-Butyl Hydroperoxide-Induced Apoptosis of HepG2 Cells. *Pharmacology* 93:137-144. doi: 10.1159/000360090
27. Hwang J-M, Wang C-J, Chou F-P, Tseng T-H, Hsieh Y-S, Lin W-L and Chu C-Y (2002) Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. *Archives of Toxicology* 76:664-670. doi: 10.1007/s00204-002-0351-9
28. Muthaiah VPK, Michael FM, Palaniappan T, Rajan SS, Chandrasekar K and Venkatachalam S (2017) JNK1 and JNK3 play a significant role in both neuronal apoptosis and necrosis. Evaluation based on in vitro approach using tert-butylhydroperoxide induced oxidative stress in neuro-2A cells and perturbation through 3-aminobenzamide. *Toxicology in Vitro* 41:168-178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.02.015>
29. Lombardi G, Varsaldi F, Miglio G, Papini MG, Battaglia A and Canonico PL (2002) Cabergoline prevents necrotic neuronal death in an in vitro model of oxidative stress. *European Journal of Pharmacology* 457:95-98. doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02683-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02683-3)
30. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
31. Riccardi C and Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1:1458-61. doi: 10.1038/nprot.2006.238

32. Lively S and Schlichter LC (2018) Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00215
33. Cui Y, Zhang Z, Zhou X, Zhao Z, Zhao R, Xu X, Kong X, Ren J, Yao X, Wen Q, Guo F, Gao S, Sun J and Wan Q (2021) Microglia and macrophage exhibit attenuated inflammatory response and ferroptosis resistance after RSL3 stimulation via increasing Nrf2 expression. *Journal of Neuroinflammation* 18:249. doi: 10.1186/s12974-021-02231-x
34. Qin Y, Sun X, Shao X, Hu MX, Feng J, Chen Z, Sun J, Zhou Z, Duan Y and Cheng C (2016) Lipopolysaccharide Preconditioning Induces an Anti-inflammatory Phenotype in BV2 Microglia. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36:1269-1277. doi: 10.1007/s10571-015-0324-1
35. Wang Q, Yao H, Liu W, Ya B, Cheng H, Xing Z and Wu Y (2021) Microglia Polarization in Alzheimer's Disease: Mechanisms and a Potential Therapeutic Target. *Frontiers in aging neuroscience* 13:772717-772717. doi: 10.3389/fnagi.2021.772717
36. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T and Boza-Serrano A (2018) Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00488
37. Ransohoff RM (2016) A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience* 19:987-991. doi: 10.1038/nn.4338
38. Song GJ and Suk K (2017) Pharmacological Modulation of Functional Phenotypes of Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in aging neuroscience* 9:139-139. doi: 10.3389/fnagi.2017.00139
39. Yan H-f, Zou T, Tuo Q-z, Xu S, Li H, Belaidi AA and Lei P (2021) Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6:49. doi: 10.1038/s41392-020-00428-9
40. Yan A, Liu Z, Song L, Wang X, Zhang Y, Wu N, Lin J, Liu Y and Liu Z (2019) Idebenone Alleviates Neuroinflammation and Modulates Microglial Polarization in LPS-Stimulated BV2 Cells and MPTP-Induced Parkinson's Disease Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00529
41. De Caris MG, Grieco M, Maggi E, Francioso A, Armeli F, Mosca L, Pinto A, D'Erme M, Mancini P and Businaro R (2020) Blueberry Counteracts BV-2 Microglia Morphological and Functional Switch after LPS Challenge. *Nutrients* 12:1830. doi: 10.3390/nu12061830

- 42.Zhou X and Spittau B (2018) Lipopolysaccharide-Induced Microglia Activation Promotes the Survival of Midbrain Dopaminergic Neurons In Vitro. *Neurotoxicity Research* 33:856-867. doi: 10.1007/s12640-017-9842-6
- 43.Cheng B, Christakos S and Mattson MP (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12:139-153. doi: 10.1016/0896-6273(94)90159-7
- 44.Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW and Gahring LC (1999) Inflammatory Cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α Impart Neuroprotection to an Excitotoxin Through Distinct Pathways. *The Journal of Immunology* 163:3963-3968.
- 45.Bissonnette CJ, Klegeris A, McGeer PL and McGeer EG (2004) Interleukin 1 α and interleukin 6 protect human neuronal SH-SY5Y cells from oxidative damage. *Neuroscience Letters* 361:40-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.01.005>
- 46.Akaneya Y, Takahashi M and Hatanaka H (1995) Interleukin-1 β Enhances Survival and Interleukin-6 Protects against MPP⁺ Neurotoxicity in Cultures of Fetal Rat Dopaminergic Neurons. *Experimental Neurology* 136:44-52. doi: <https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1082>
- 47.Brittain MK, Brustovetsky T, Sheets PL, Brittain JM, Khanna R, Cummins TR and Brustovetsky N (2012) Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Neurobiology of Disease* 46:109-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.051>
- 48.Krasil'nikova I, Surin A, Sorokina E, Fisenko A, Boyarkin D, Balyasin M, Demchenko A, Pomytkin I and Pinelis V (2019) Insulin Protects Cortical Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Frontiers in Neuroscience* 13. doi: 10.3389/fnins.2019.01027
- 49.Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA and Vavilis TD (2015) Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9. doi: 10.3389/fncel.2015.00091
- 50.Polazzi E, Altamira LEP, Eleuteri S, Barbaro R, Casadio C, Contestabile A and Monti B (2009) Neuroprotection of microglial conditioned medium on 6-hydroxydopamine-induced neuronal death: role of transforming growth factor beta-2. *Journal of Neurochemistry* 110:545-556. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06117.x>
- 51.Quispe RL, Canto RFS, Jaramillo ML, Barbosa FAR, Braga AL, de Bem AF and Farina M (2018) Design, Synthesis, and In Vitro Evaluation of a Novel Probucol Derivative: Protective Activity in Neuronal Cells Through GPx Upregulation. *Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s12035-018-0939-6

52. Wenz C, Faust D, Linz B, Turmann C, Nikolova T, Bertin J, Gough P, Wipf P, Schröder AS, Krautwald S and Dietrich C (2018) t-BuOOH induces ferroptosis in human and murine cell lines. *Archives of Toxicology* 92:759-775. doi: 10.1007/s00204-017-2066-y
53. Zhao K, Luo G, Giannelli S and Szeto HH (2005) Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptosis induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. *Biochemical Pharmacology* 70:1796-1806. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.08.022>
54. Wu C, Zhao W, Yu J, Li S, Lin L and Chen X (2018) Induction of ferroptosis and mitochondrial dysfunction by oxidative stress in PC12 cells. *Scientific Reports* 8:574. doi: 10.1038/s41598-017-18935-1
55. Yoo S-J, Cho B, Lee D, Son G, Lee Y-B, Soo Han H, Kim E, Moon C and Moon C (2017) The erythropoietin-derived peptide MK-X and erythropoietin have neuroprotective effects against ischemic brain damage. *Cell Death & Disease* 8:e3003-e3003. doi: 10.1038/cddis.2017.381
56. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R and Sharma PL (2013) Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology* 698:6-18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>
57. Lai TW, Zhang S and Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology* 115:157-188. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>
58. Tobaben S, Grohm J, Seiler A, Conrad M, Plesnila N and Culmsee C (2011) Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death & Differentiation* 18:282-292. doi: 10.1038/cdd.2010.92

Fig. 1

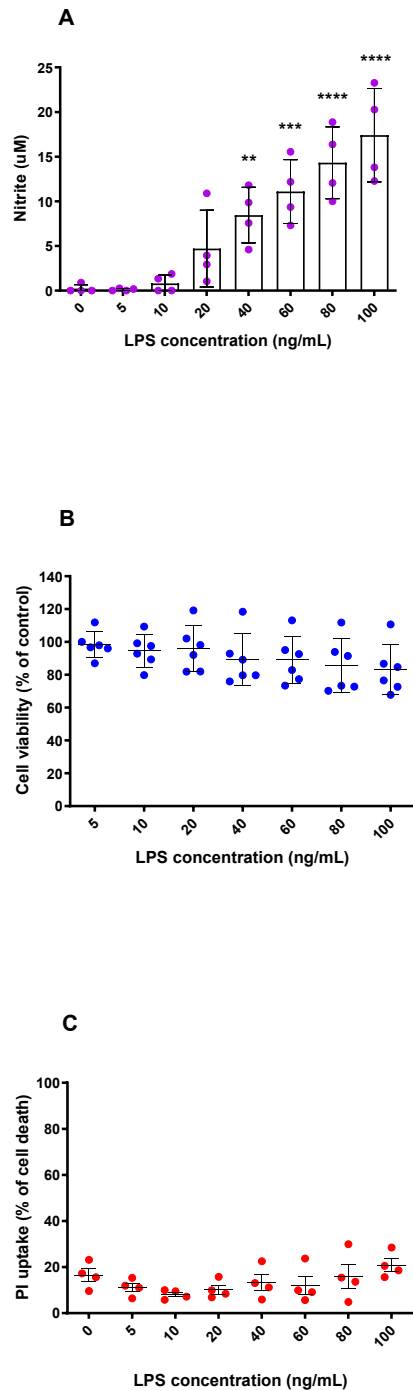


Fig. 1 Effects of LPS on nitrite release and cell viability in BV-2 microglial cells. Concentration-dependent nitrite release from BV-2 cells was detected by the Griess method, suggesting microglial activation (A). BV-2 cells viability was not significantly affected by LPS exposure when compared to control using MTT and PI assays (B and C). * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated cells). In C, 100% cell death is represented by cells treated with 0.2% Triton X-100 for 20 minutes. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. A and C $n=4$; B $n=6$.

Fig. 2

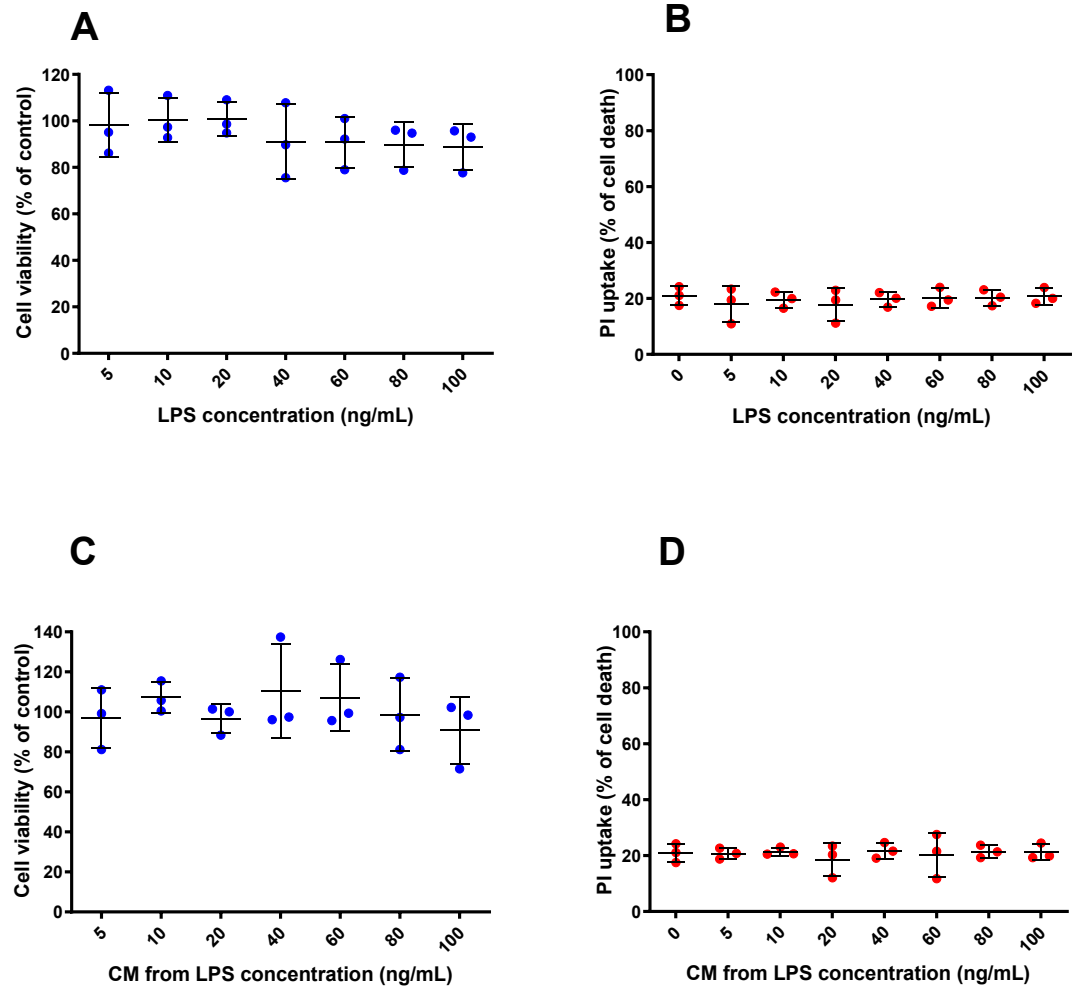


Fig. 2 Effect of LPS and conditioned media (CM) on HT22 cell viability. Different concentrations of LPS (A and B) and CM produced by LPS-stimulated BV-2 cells (C and D) did not significantly affect cell viability of HT22 cells when compared to control group (untreated cells). 100% death: cells treated with 0.2% Triton X-100 for 20 minutes. n=3.

Fig. 3

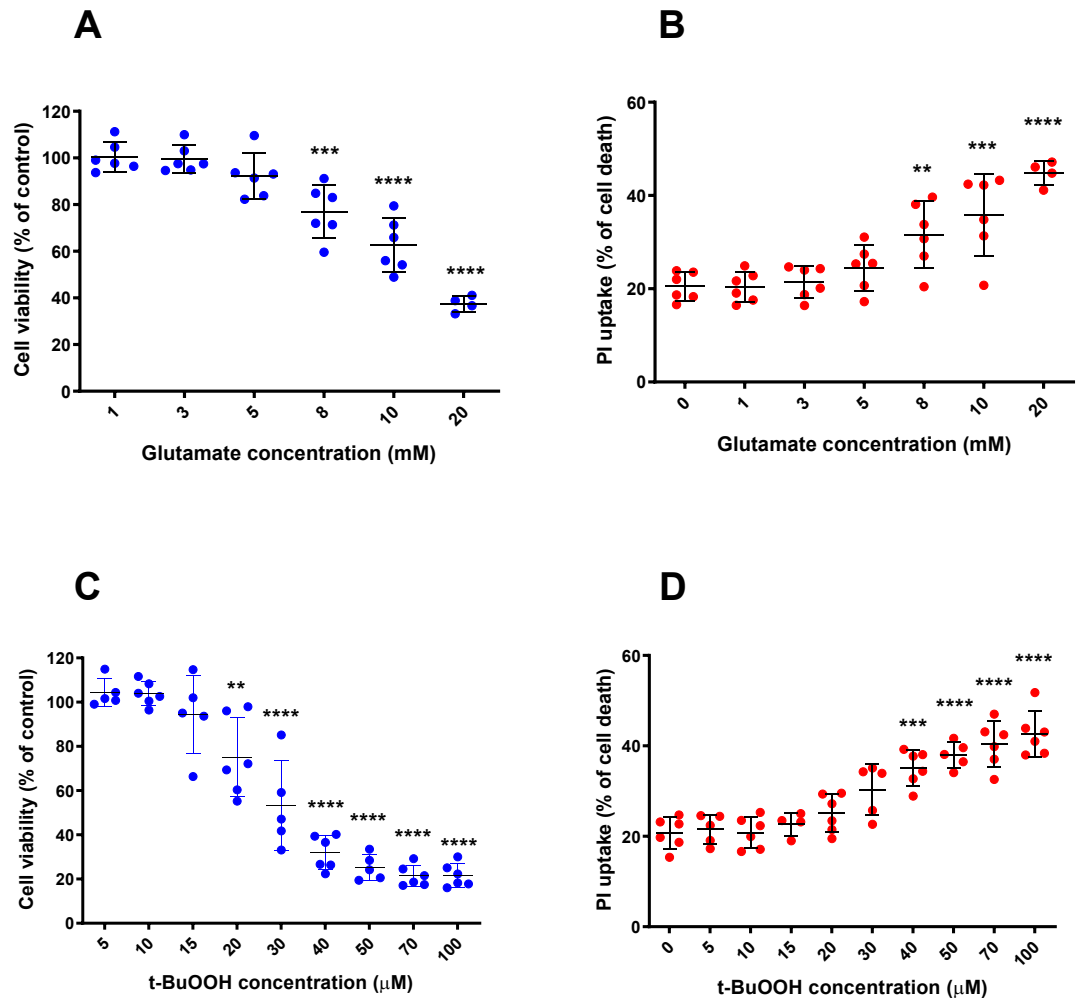


Fig. 3 Effects of Glutamate and *t*-BuOOH on HT22 cell viability. HT22 cells exposed to glutamate (A and B) and *t*-BuOOH (C and D) exhibited a progressive (concentration dependent) impairment of cell viability in both tested methodologies (MTT and PI). In B and D, 100% cell death is represented by cells treated with 0.2% Triton X-100 for 20 minutes. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared to control group (untreated cells). $n=6$.

Fig. 4

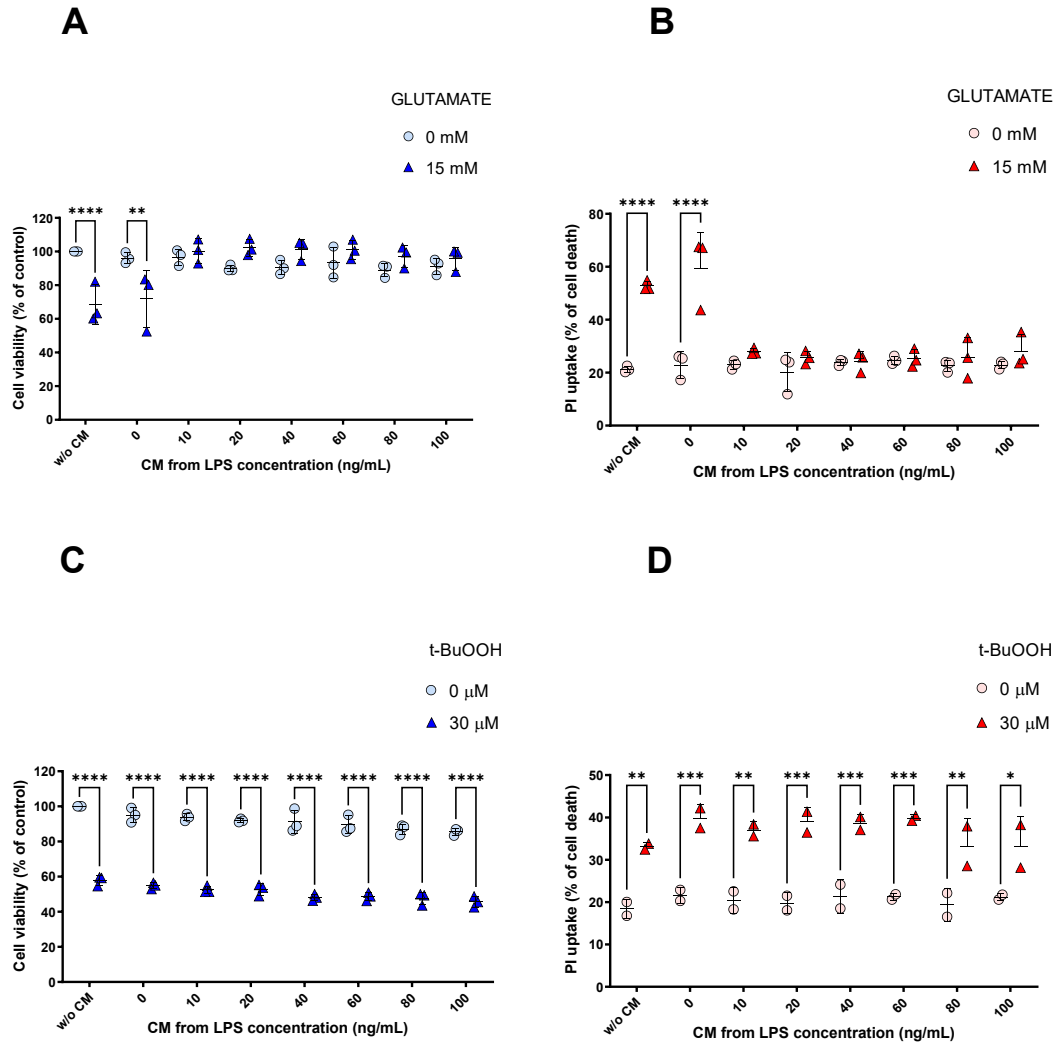


Fig. 4 Effects of CM on protection against damage caused by glutamate and *t*-BuOOH in HT22 cells. HT22 cells exposed for 6 h to CM showed protection against cytotoxicity induced by 15 mM glutamate (A and B). However, this was not observed in the *t*-BuOOH paradigm (C and D). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ compared to the respective controls (cells not treated with glutamate or *t*-BuOOH; $n=3$). In B and D, 100% cell death is represented by cells treated with 0.2% Triton X-100 for 20 minutes.

Supporting Information

Supplemental Table 1: Chemicals and reagents used in the study.

Chemicals/reagents	Supplier	Code
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
Antibiotic-Antimycotic (100X)	Thermo Fisher	15240062
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich	472301; D2650
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Thermo Fisher	12100046
Fetal bovine serum (FBS)	Thermo Fisher	16140071
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich	H8264
L-Glutamic acid	Sigma-Aldrich	G1251
Lipopolysaccharides from <i>Escherichia coli</i> O111:B4	Sigma-Aldrich	L2630
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride	Sigma-Aldrich	222488
Propidium iodide (PI)	Sigma-Aldrich	P4170
Sulfanilamide	Sigma-Aldrich	S9251
<i>tert</i>-Butyl hydroperoxide (t-BuOOH)	Sigma-Aldrich	458139
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher	15400054