

Neuroproteção no AVC

Ricardo Manuel Cardoso Verde

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor Francisco José Álvarez Pérez

maio de 2020

Folha em branco

Dedicatória

A toda a minha família, os meus pais e irmão, por todo o apoio e incentivo durante todo este meu percurso académico.

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Alvarez, primeiro por ter aceitado o meu convite para ser orientador da minha dissertação de mestrado, e pela pronta disponibilidade em responder a todas as minhas dúvidas e a todo o apoio ao longo da realização da dissertação.

Um agradecimento aos meus pais, ao meu irmão e à minha cunhada por todo o apoio, acompanhamento e paciência não só durante a realização da dissertação, mas também ao longo de todo o meu curso de Medicina.

Por fim, um agradecimento aos meus colegas e amigos, Rui, Sofia e Mariana, que me sempre apoiaram.

Resumo

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) caracteriza-se por um déficit focal ou global da função cerebral, de início súbito, que persiste por um período superior a 24 horas, sem outra causa aparente senão a de origem vascular. Atualmente, o AVC é a segunda maior causa de morte no mundo e a principal causa de morte e incapacidade em Portugal, com um gasto de milhões de euros todos os anos.

O tratamento atual é limitado, consistindo no restabelecimento da perfusão sanguínea do tecido cerebral isquémico através da trombólise intravenosa e trombectomia endovascular. No entanto, apesar dos seus comprovados benefícios, estas duas terapias apresentam diversas limitações e critérios de inclusão e exclusão, levando a que muitos dos pacientes não sejam intervencionados com estas técnicas.

A presente dissertação tem como objetivo realizar uma revisão de novas terapias de intervenção no AVC, as terapias neuroprotetoras, quer de estudos em modelos animais e ensaios clínicos passados, como os que estão em andamento ou programados.

A neuroprotecção corresponde a um tratamento com a capacidade de prolongar a tolerância do tecido cerebral à isquemia. As terapias neuroprotetores tem sido estudadas à décadas, no entanto, apesar do seu aparente sucesso em modelos animais, esses mesmos resultados não tem sido demonstrados em ensaios clínicos em humanos.

É necessária uma otimização dos estudos em modelos animais, de modo a melhor mimetizarem as características dos doentes que sofrem AVC, e possivelmente realizar novos estudos que combinem terapias neuroprotetoras.

Palavras-chave

Neuroprotecção, acidente vascular cerebral

Abstract

Stroke is defined as developed clinical signs of focal (or global) disturbance of cerebral function, with sudden onset, lasting more than 24 hours or leading to death, with no apparent cause other than of vascular origin. Nowadays, stroke is the second leading cause of death in the world and the leading cause of death and disability in Portugal, costing millions every year.

Current treatment is limited and consists in the restoration of blood flow to the regions of brain that are ischemic using intravenous thrombolysis and endovascular thrombectomy. However, despite their proven benefits, these two therapies have a lot of limitations and inclusion and exclusion criteria, which results in many patients not being eligible to receive these treatments.

The present dissertation's main objective is to review new stroke neuroprotective treatments and techniques, both in studies in animal models and past clinical trials, as in ongoing or future ones.

Neuroprotection is a treatment capable of extending the tolerability of the cerebral tissue to ischemic insult. The neuroprotection therapies have been studied for decades, however, despite their apparent success in animal models, the same results have not been found in clinical trials in humans.

It is necessary to optimize the animal models' studies and experiments, in order to better mimic the characteristics of the patients that suffer a stroke, and possibly, conduct new studies that combine different neuroprotective therapies,

Keywords

Neuroprotection, stroke

Índice

Resumo.....	V
Palavras-chave.....	V
Abstract	VI
Keywords	VI
Índice.....	VII
Lista de acrónimos	VIII
Introdução.....	1
Metodologia.....	1
Acidente Vascular Cerebral	2
Definição	2
Epidemiologia.....	2
Abordagem e Tratamento.....	2
Neuroproteção.....	4
Alvos da neuroprotecção	4
Excitotoxicidade	4
Inflamação.....	4
Stress oxidativo	4
Disfunção da barreira hematoencefálica	5
Apoptose	5
Autofagia	6
Novas terapias: ensaios clínicos.....	6
Agentes que atenuam a excitotoxicidade.....	6
Outros neuromoduladores.....	8
Agentes antioxidantes.....	8
Agentes anti-inflamatórios.....	9
Estatinas	11
Estabilizadores de membrana e fatores neurotróficos.....	11
Outras moléculas.....	12
Hipotermia	13
Ensaio clínicos em curso	13
Conclusão	15
Bibliografia	17

Lista de acrónimos

ABC	Airway, Breathing, Circulation
ADP	Adenosina Difosfato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHE	Barreira Hematoencefálica
EPO	Eritropoietina
GBD	Global Burden of Disease Study
IFN- β	Interferão β
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 6
IL-6	Interleucina 10
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
NMDA	N-methyl-D-aspartato
NOX	NADPH Oxidase
OMS	Organização Mundial de Saúde
RM	Ressonância Magnética
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tomografia Computorizada
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

Introdução

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é atualmente a segunda maior causa de morte no mundo e a principal causa de morte em Portugal, representando 9.9% da mortalidade em 2018, seguido pela doença isquémica do coração.(1,2)

Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), o AVC é definido como um desenvolvimento súbito de sinais e sintomas de déficit neurológico focal ou global, com duração superior a 24 horas, e sem outra causa aparente senão a de origem vascular.(3)

Atualmente, nas *guidelines* internacionais as únicas terapias aprovadas na abordagem e tratamento do AVC agudo estão centradas no restabelecimento da circulação sanguínea o mais rapidamente possível, através da trombólise intravenosa e trombectomia endovascular.(4) No entanto, uma das principais limitações destas duas intervenções é a janela terapêutica estreita, com benefícios superiores quando aplicada até 3 horas e não devendo ser aplicada após 4.5 horas.(4)

A neuroprotecção tem recebido cada vez mais atenção nos últimos anos na procura de terapias adicionais que poderão permitir um aumento temporal da janela terapêutica da trombólise intravenosa e trombectomia endovascular, e aumentar e prolongar a capacidade e tolerância do tecido cerebral à lesão isquémica. No entanto, a passagem de terapias neuroprotetoras de ensaios experimentais para a clínica tem sido difícil, e atualmente não existem qualquer tratamento aprovado nas *guidelines* internacionais.

Sendo assim, é neste contexto que o objetivo desta dissertação consiste numa revisão bibliográfica de artigos científicos das diferentes terapias neuroprotetoras até agora testadas em modelos animais e em ensaios clínicos em humanos, e as atualmente em curso.

Metodologia

A realização desta monografia teve como base a leitura de artigos científicos. Estes artigos foram encontrados através do motor de busca *PubMed* e *ScienceDirect*, utilizando as seguintes palavras-chaves: *stroke*; *neuroprotection*. Foram selecionados artigos em inglês e sem limite temporal. Foram também realizadas pesquisas no site *clinicaltrials.gov*. Além disso, foram também utilizados livros de referência da área de neurologia e AVC.

Acidente Vascular Cerebral

Definição

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) caracteriza-se por um déficit focal ou global da função cerebral, de início súbito, que persiste por um período superior a 24 horas, sem outra causa aparente senão a de origem vascular(3).

Epidemiologia

De acordo com o *Global Burden of Disease Study 2016* (GBD) o AVC é a segunda maior causa de morte no mundo, com um número estimado de 5.5 milhões de óbitos em 2016, só ultrapassado pela doença cardíaca isquémica. Além disso, é a segunda maior causa de morbidade no mundo, com um número estimado de 116.4 milhões de DALYs (*Disability-Adjusted Life Year*) em 2016, que tem vindo a aumentar desde 1990 (95.3 milhões)(1).

Em Portugal, o AVC apresenta um impacto muito significativo, sendo a principal causa de morte no país (9.9%), seguido das doenças coronárias e pneumonia.(2)

Abordagem e Tratamento

A abordagem e o tratamento agudo, subagudo e crónico do AVC baseiam-se em objetivos diferentes. Na chegada à urgência, deve ser realizada uma avaliação inicial de modo a garantir a estabilidade do paciente, com especial enfoque no *Airway, Breathing, Circulation* (ABC), e com monitorização dos sinais vitais. É recomendado uma monitorização e vigilância constante e contínua dos valores de glucose, tensão arterial, saturação de oxigénio e da temperatura.(4)

A recolha da história clínica é importante para excluir outras causas com uma apresentação semelhante à do AVC e para estabelecer o início temporal dos sintomas, pois é um dos principais critérios de elegibilidade para o tratamento com trombólise intravenosa e trombectomia endovascular.

A neuroimagiologia tem um papel fundamental na abordagem do AVC e possui 4 objetivos principais: excluir a presença de hemorragia intracraniana, identificar uma oclusão dos grandes vasos como alvo para trombectomia, determinar o volume de necrose cerebral irreversível aquando a chegada, e estimar o volume de lesão cerebral isquémica potencialmente reversível que é alvo de tratamento, e que pode evoluir para lesão irreversível na ausência de reperfusão (área de penumbra).(5)

O principal exame complementar de diagnóstico usado em pacientes com sintomatologia suspeita de AVC é a tomografia computadorizada (TC) sem contraste.(6) É um exame específico, mas relativamente insensível na identificação de alterações isquémicas

iniciais.(5) Tem, no entanto, uma função essencial na abordagem e tratamento na urgência do AVC agudo, pois permite excluir a presença de hemorragia intracraniana, a qual é uma contraindicação absoluta para a trombólise intravenosa.(5) Além disso, permite excluir outras causas de défices neurológicos, como o hematoma subdural, tumores cerebrais e outras lesões ocupantes de espaço.(6)

A ressonância magnética (RM) com difusão, apesar de mais demorada, menos acessível e mais dispendiosa, apresenta uma maior sensibilidade e especificidade em comparação com a TC sem contraste, e consegue detetar e delinear tecido cerebral isquémico potencialmente enfartado irreversivelmente, apesar de reperfusão atempada e adequada.(5) É também útil fora do período agudo, na determinação mais precisa da extensão da lesão isquémica e na discriminação entre regiões de enfarte antigas e novas.(7)

A angiografia por TC é útil na deteção e na identificação de oclusões de vasos proximais que podem ser alvos de trombectomia endovascular.(4,6)

O tratamento do AVC na urgência envolve duas modalidades: trombólise intravenosa e trombectomia endovascular. Atualmente, estas duas modalidades são as únicas intervenções recomendadas nas *guidelines* internacionais em contexto de urgência.(4)

A trombólise intravenosa é tempo dependente e deve ser iniciada imediatamente nos doentes que sejam elegíveis. A janela de intervenção recomendada não deve ultrapassar as 4.5h após início dos sintomas. No entanto, os benefícios são superiores quando a terapia é iniciada até às 3h.(4)

A trombectomia endovascular é uma técnica que consiste na remoção de um trombo através da introdução de um *stent* guiado por imagiologia, nas primeiras 24 horas, quando o paciente preenche os requisitos para a sua realização.(4,8,9)

Neuroproteção

A neuroproteção corresponde a um tratamento com a capacidade de prolongar a tolerância do tecido cerebral à isquemia, intervindo em processos celulares, bioquímicos e metabólicos. Durante as últimas décadas tem sido realizados diversos estudos e ensaios clínicos com objetivo de encontrar uma terapia neuroprotetora eficaz no AVC isquémico.(8,10)

Alvos da neuroproteção

Excitotoxicidade

A excitotoxicidade é um dos principais componentes da fisiopatologia durante uma lesão isquémica cerebral. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e a sua excessiva libertação é uma característica chave da excitotoxicidade.(11)

O ambiente anóxico e a interrupção da produção de energia, leva a um desregulamento dos canais iónicos da membrana celular e à despolarização da última, que por sua vez, resulta na libertação de glutamato. A grande concentração deste neurotransmissor no espaço extracelular leva a uma ativação dos recetores do glutamato, como o recetor N-methyl-D-aspartato (NMDA) e o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA).(11)

A ativação destes recetores leva a um excessivo influxo de cálcio e a ativação de enzimas cálcio-dependentes, com um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio. Todos estes fatores levam à ativação de vias de morte celular. As várias fases e substâncias envolvidas neste processo, permitem diversas estratégias de neuroproteção.(11)

Inflamação

A inflamação assume um papel importante na fisiopatologia do AVC. Durante a fase aguda, o tecido afetado e as células gliais libertam mediadores pro-inflamatórios, como as citocinas, que por sua vez levam à expressão de moléculas de adesão celular e ao recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, células T, macrófagos).(12)

Uma das principais moléculas envolvidas no dano e morte celular após o AVC é o fator de necrose tumoral alfa (TNF α). A sua ação é exercida através da ativação de dois recetores, R1 e R2, que levam ao início de cascatas de morte celular.(13)

Stress oxidativo

O stress oxidativo é uma perturbação do equilíbrio oxidativo e anti-oxidativo que resulta em dano celular. Um dos principais contribuintes são os radicais livres (anião superóxido, radical hidroxilo, espécies reativas de nitrogénio), capazes de alterar a expressão de genes e

proteínas. O stress oxidativo acontece quando existe produção excessiva de espécies reativas de oxigénio e outros radicais livres, que ultrapassa a capacidade da sua neutralização.(14)

Durante a isquemia no AVC, os tecidos afetados encontram-se num estado anóxico. Este ambiente de anoxia, leva a uma redução da produção de energia, na forma de fosfatos de alta energia, que provoca uma despolarização da membrana celular e libertação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato. Por sua vez, o glutamato causa entrada de cálcio e aumento da sua concentração intracelular, posteriormente responsável pela ativação de vias de morte celular. Além disso, o aumento do sódio e cálcio intracelular, assim como da adenosina difosfato (ADP), provocam um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio na mitocôndria, contribuindo para o aumento de radicais livres.(14)

A NADPH oxidase (NOX) é uma enzima que também desempenha um papel central no stress oxidativo durante um AVC. A sua ativação durante a isquemia leva à produção do radical superóxido, que por sua vez contribui para o stress oxidativo. Das várias isoformas da NOX, a NOX2 e NOX4 são as mais importantes na patogénese da lesão isquémica.(14)

Disfunção da barreira hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) refere-se às características únicas presentes na microvasculatura do Sistema Nervoso Central (SNC). Esta barreira permite uma regulação restrita do movimento de moléculas, iões e células entre o sangue e o SNC. Assim, a BHE desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase e na proteção do SNC contra patógenos, toxinas, inflamação e doenças.(15)

Durante o AVC isquémico, várias substâncias contribuem para a disfunção da BHE. As citocinas constituem um grupo importante. A interleucina 1 (IL-1), o $TNF\alpha$, a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 10 (IL-10), o $TNF\alpha$ (IFN- β) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) são mediadores importantes na disfunção da BHE.(16)

O stress oxidativo causado por espécies reativas de oxigénio e outros radicais livres também tem um papel importante na disfunção da BHE, particularmente as enzimas pertencentes à família das NOX.(16)

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes do zinco que tem um papel na disfunção da BHE. A MMP-2 e a MMP-9 tem tido um foco maior devido à sua capacidade de degradação da membrana basal, devido à sua ação sobre o colagénio tipo IV, laminina e fibronectina, os constituintes principais da lamina basal dos vasos cerebrais.(16)

Apoptose

Nos momentos iniciais do AVC isquémico, a zona central da lesão sofre uma redução dramática do fluxo sanguíneo e conseqüentemente leva a uma morte celular por necrose.

Envolvendo este núcleo necrótico existe uma região chamada zona de penumbra, onde o reduzido fluxo sanguíneo é ainda suficiente para as células serem metabolicamente ativas. Diversos estudos revelaram que muitos neurónios localizados na zona de penumbra sofrem apoptose após várias horas ou dias. Como a apoptose constitui um conjunto de processos ordenados e programados, é possível intervir nas diferentes etapas e recuperar os neurónios que se encontram nessa zona de penumbra.(17)

Autofagia

A autofagia é definida como um processo catabólico onde as proteínas e organelos disfuncionais são destruídas pelas células por uma via dependente do lisossoma de modo a restaurar a homeostasia. Durante o AVC isquémico, vários fatores de stress contribuem para a ativação e aumento da atividade autofágica dentro da célula, sendo as espécies reativas de oxigénio, a acumulação de proteínas disfuncionais, oxidadas ou danificadas e o aumento do cálcio intracelular, os fatores mais importantes.(18)

A autofagia desempenha um papel importante em diversos processos fisiológicos, assim como em vários processos patológicos. A disrupção do processo autofágico é deletéria, devido à acumulação de moléculas e organelos disfuncionais. No entanto, o seu impacto no AVC isquémico é ainda controverso. Pode ter um efeito benéfico, protegendo o neurónio através da degradação de organelos danificados, adiando a apoptose. No entanto, outros estudos indicam que a sua inibição protege as células neuronais da apoptose, sugerindo que a autofagia leve à morte celular.(19)

Novas terapias: ensaios clínicos

Agentes que atenuam a excitotoxicidade

Os antagonistas dos canais de cálcio são um grupo de fármacos que recebeu uma grande atenção na sua potencial utilidade como neuroprotetor no AVC isquémico. A nimodipina é um fármaco normalmente usado no tratamento para a pressão arterial elevada. O seu efeito neuroprotetor foi inicialmente identificado em modelos animais.(20) Um ensaio clínico identificou um possível benefício da nimodipina, no entanto muitos dos outros realizados posteriormente não conseguiram identificar esse efeito.(21,22) Uma meta análise com a análise de 29 ensaios clínicos igualmente descarta este efeito neuroprotetor da nimodipina.(22)

O monosialogangliosídeo GM-1 pertence à classe de glicosfingolípidos. Os seus efeitos neuroprotetores parecem estar associados a atenuação da excitotoxicidade. O ensaio clínico EST (Early Stroke Trial) com o envolvimento de 834 pacientes, demonstrou melhorias funcionais significativas, sem toxicidade e efeitos adversos significativos.(23)

Os antagonistas do recetor NMDA foram um dos primeiros agentes terapêuticos para o AVC agudo a serem testados em humanos num ensaio clínico. A sua potencial utilidade foi inicialmente reconhecida aquando a observação de que um insulto isquémico no cérebro levaria a um aumento dos níveis do neurotransmissor excitatório glutamato.(24)

O monosialogangliosídeo GM-1 pertence à classe de glicoesfingolípidos. Os seus efeitos neuroprotetores parecem estar associados a atenuação da excitotoxicidade. O ensaio clínico EST (Early Stroke Trial) com o envolvimento de 834 pacientes, demonstrou melhorias funcionais significativas, sem toxicidade e efeitos adversos significativos.(23)

O *Selfotel* (CGS 19755) é um antagonista competitivo do recetor de glutamato do tipo NMDA que se liga diretamente ao local de ligação do NMDA no recetor, inibindo a ação do glutamato no ambiente excitatório da isquemia aguda.(25) O seu potencial como neuroprotetor foi identificado em modelos animais, onde foi evidenciado uma redução do tamanho do enfarte e do dano neuronal.(26,27) Tendo em conta estes resultados, foram realizados dois ensaios clínicos paralelos de fase 3, duplamente cegos, randomizados e controlados por placebo para testar esta hipótese. No entanto, o ensaio clínico foi suspenso precocemente devido a uma tendência de mortalidade aumentada no grupo do *Selfotel*. A análise dos dados dos pacientes que até aí participaram indicou que o *Selfotel* não seja benéfico no AVC isquémico e que tenha um potencial efeito prejudicial.(25)

Aptiganel é um ligando seletivo para o canal iónico do subtipo NMDA do recetor de glutamato.(28) Um estudo realizado num modelo animal evidenciou uma redução significativa do volume do enfarte e um melhor status neurológico no grupo tratado com *Aptiganel*.(29) De modo a testar a sua eficácia em humanos, dois ensaios clínicos de fase 2 e 3 foram realizados. O ensaio clínico de fase 2 revelou um aumento de mortalidade no grupo do *Aptiganel* o que levou a uma interrupção do ensaio clínico de fase 3. Além do aumento da mortalidade, não foram detetadas diferenças significativas na eficácia entre o placebo e o grupo do *Aptiganel*.(28)

O magnésio (Mg^{2+}) é um neuroprotetor promissor devido ao seu baixo preço, à sua ampla disponibilidade, facilidade de administração e perfil de eventos adversos favorável. Além disso, demonstrou um efeito neuroprotetor em modelos animais.(30) O ensaio clínico de fase 3 *Field Administration of Stroke Therapy–Magnesium* (FAST-MAG) testou a hipótese de que a administração de sulfato de magnésio por paramédicos no período hiperagudo do ACV levasse a melhores resultados funcionais a longo prazo. No entanto, o grupo do Mg^{2+} não demonstrou um menor nível de incapacidade ao 90 dias em comparação com o grupo controlo.(10)

O *Gavestinel* (GV150526) é um antagonista do local de glicina do recetor NMDA. A sua eficácia foi inicialmente demonstrada num modelo animal que detetou uma redução significativa do tamanho do enfarte.(31) Dois ensaios clínicos de grande dimensão, o GAIN Americas e o GAIN International, distribuíram aleatoriamente 1367 e 1455 pacientes, respetivamente, em dois grupos, tratamento com *Gavestinel* e placebo. Não foram encontradas diferenças significativas no tratamento entre os dois grupos e não foram detetados efeitos adversos significativos do *Gavestinel*.(32)

Os bloqueadores dos recetores AMPA constituem outro grupo alvo da neuroprotecção. O ZK200775 é um agente com afinidade para o local de ligação do recetor AMPA e com reduzida afinidade para o recetor NMDA, e que demonstrou atividade neuroprotetora em modelos animais.(33) Um ensaio clínico de fase 2 avaliou o dano às células gliais e o dano neurológico através da medição dos marcadores S-100B e enolase, respetivamente. Foi identificado um aumento transitório de deterioração neurológica nos pacientes tratados com ZK200775, associado a um aumento do dano às células gliais.(33) Estes resultados corroboram a evidência da toxicidade dos antagonistas de glutamato.

Outros neuromoduladores

A clomethiazole é um agonista do GABA_A que promove a inibição da neurotransmissão induzida pelo GABA_A. O ensaio clínico CLASS (*The Clomethiazole Acute Stroke Study*) tinha como objetivo testar se a administração de clomethiazole melhoraria os indicadores funcionais e neurológicos dos pacientes. Apesar de não ter sido detetada nenhuma diferença significativa entre os grupos, foi detetada uma ligeira tendência positiva no subgrupo de pacientes com AVC de maiores dimensões. Para testar esta hipótese, o CLASS-1 teve o envolvimento de 1198 pacientes. No entanto, o estudo falhou na confirmação desta hipótese, sendo que não houve melhoria nos vários indicadores.(34)

Agentes antioxidantes

O mesilato de tirilazad (U-74006F) é um aminoesteróide com um proposto mecanismo de ação onde ocorre a inibição da peroxidação depende de ferro de lípidos nas membranas. O seu potencial como neuroprotetor foi inicialmente identificado após resultados promissores em modelos animais, com redução da mortalidade.(35) Uma revisão sistemática de seis ensaios clínicos, todos duplamente cegos e controlados por placebo, concluiu que o mesilato de tirilazad não só é ineficaz no AVC isquémico, como potencialmente leva a piores resultados.(36)

Outro antioxidante que inibe a peroxidação de lípidos é o ebselen, um composto selenorgânico sintético, que demonstrou atividade neuroprotetora em modelos animais, com uma redução do volume de enfarte.(37) O primeiro ensaio clínico a ser realizado para

testar a sua eficácia em humanos envolveu 302 pacientes, divididos em dois grupos. O estudo foi duplamente cego e controlado por placebo. Apesar de não ter havido uma redução significativa na mortalidade global entre dois grupos, verificou-se uma diferença significativa nos *outcomes* nos pacientes tratados nas primeiras 24 horas, com o grupo tratado com ebselen a apresentar melhorias funcionais significativas no primeiro mês, mas não ao terceiro mês. Com base nestes resultados, os autores consideraram o ebselen possivelmente útil como agente neuroprotetor no AVC isquêmico.(38)

O edaravone é outro antioxidante com capacidade de inibir a peroxidação de lípidos e o dano a células endoteliais vasculares. Estudos em modelos animais revelaram a sua potencial utilidade como agente neuroprotetor. Foi realizado um ensaio clínico duplamente cego, controlado por placebo, e randomizado, com o envolvimento de 250 pacientes. Os resultados foram bastante promissores, visto que o grupo que recebeu o edaravone teve uma melhoria funcional significativa, que se manteve após 12 meses de *follow-u*, e sem efeitos adversos consideráveis.(39) Desde então, o edaravone foi aprovado no Japão e faz parte das *guidelines* japonesas para a abordagem do AVC.(40)

O NXY-059 é uma substância pertencente a outro grupo de antioxidantes, os agentes *spin-trapping*, com a capacidade de se ligarem a radicais livres instáveis e formar uma substância mais estável. A sua potencial utilidade no tratamento do AVC foi inicialmente identificada em modelos animais.(41) Dois ensaios clínicos, o SAINT I e o SAINT II foram realizados para testar a eficácia do NXY-059 no AVC isquêmico. O primeiro ensaio envolveu 1722 pacientes e teve resultados promissores, com uma diferença significativa nos indicadores primários. De modo a confirmar estes resultados, foi realizado um segundo ensaio clínico, o SAINT II, com análise de 3195 pacientes. No entanto, contrariamente aos resultados do SAINT I, os autores concluíram que, apesar de seguro, o NXY-059 é ineficaz no tratamento do AVC isquêmico.(42,43)

Agentes anti-inflamatórios

O enlimomab é um anticorpo monoclonal que se liga à molécula ICAM-1 e que inibe a adesão de leucócitos ao endotélio.(44) Imediatamente após o AVC, os níveis de ICAM-1 aumentam no endotélio, o que leva a um maior recrutamento de leucócitos para o SNC e a um aumento do dano mediado por estas células. Foi realizado um estudo em modelo animal de modo a testar a eficácia do enlimomab. Concluiu-se que o enlimomab reduz o dano isquêmico nos modelos de reperfusão, mas não nos modelos com oclusão irreversível.(45) Para testar a eficácia em humanos, um ensaio clínico de fase 3 envolveu 625 pacientes. Apesar dos resultados positivos nos modelos animais, este estudo chegou à conclusão de que o grupo tratado com enlimomab não só não foi eficaz, como levou a resultados negativos em relação ao grupo do placebo. No entanto, os autores questionaram a possível utilidade de agentes

imunomodulatórios administrados concomitantemente com terapia de reperfusão, de modo a reduzir o dano da reperfusão. Além disso, a análise dos dados revelou uma possível reação imunológica contra o anticorpo devido à sua origem em roedores.(44)

Para este efeito, um anticorpo IgG₁ humano direcionado para o CD18 foi usado noutro ensaio clínico para testar essa hipótese. No entanto, uma análise precoce dos dados levou à sua interrupção devido à baixa probabilidade de existirem quaisquer benefícios.(46)

Outro alvo na cascata da inflamação é a ativação dos leucócitos. O fator inibidor de neutrófilos (UK-279276) é uma glicoproteína recombinante com ligação seletiva para a integrina CD11b/CD18 que bloqueia a adesão de neutrófilos ativados ao endotélio. Um ensaio clínico realizado em ratos demonstrou um efeito neuroprotetor significativo no modelo com reperfusão, com redução do volume de enfarte.(47) O ASTIN (*Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils*) foi um ensaio clínico de fase 2 com o objetivo de encontrar a dose correta do UK-279276 no tratamento do AVC isquémico. Apesar dos autores terem concluído que o UK-279276 é bem tolerado e sem efeitos adversos significativos, o estudo foi terminado precocemente devido a futilidade terapêutica.(48)

A minociclina é uma tetraciclina de segunda geração que para além dos seus efeitos antimicrobianos, exerce um efeito anti-inflamatório, e é bem tolerada. Um estudo realizado em modelos animais constatou uma redução significativa do volume do enfarte, assim como uma redução da atividade da COX-2 e da MMP-9, envolvidos na cascata de inflamação e na disfunção da BHE, respetivamente.(49) Um ensaio clínico envolvendo 152 pessoas encontrou resultados positivos quer nos indicadores primários e secundários, no entanto os autores chamam a atenção a limitações do estudo, entre as quais o número da amostra ser pequeno, o facto de terem recebido tratamento oralmente e ter sido administrado entre 6 a 24 horas.(50)

Os corticosteroides, devido ao seu efeito anti-inflamatórios, poderiam ser usados para inibir a cascata de inflamação no AVC. No entanto, uma revisão sistemática dos vários ensaios clínicos realizados concluiu que não existe evidência suficiente que permite o seu uso no tratamento do AVC.(51)

A albumina sérica humana é uma proteína multifuncional com demonstrados efeitos neuroprotetores em modelos animais, e com diversos mecanismos de ação propostos, entre os quais, a hemodiluição, antioxidante e manutenção da integridade da microvascular.(52) O ensaio clínico ALIAS foi realizado de modo a testar estes efeitos em humanos. O ALIAS parte 1 foi interrompido precocemente devido a razões de segurança.(53) O ALIAS parte 2 alterou o desenho do estudo tendo em conta estes aspetos de segurança e tinha como objetivo verificar se existia resultados favoráveis após 90 dias. No entanto o estudo foi

terminado precocemente devido a futilidade e não foram encontradas diferenças entre os dois grupos.(54)

Estatinas

O inibidor da 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase (estatinas) tem uma história bem documentada dos seus benefícios no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares. No entanto, a sua potencial utilidade na neuroproteção no AVC isquémico tem recebido cada vez mais interesse. Vários modelos animais confirmaram efeitos promissores na redução da severidade e volume do enfarte.(55) O ensaio ASSORT (*Administration of Statin on Acute Ischemic Stroke Patient*) foi um estudo clínico randomizado controlado, com o envolvimento de 270 pacientes, com o objetivo de testar a hipótese de que a administração de estatinas na fase aguda do AVC leva a melhorias funcionais significativas após 90 dias. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos.(56) Estes resultados vão ao encontro dos resultados do ensaio clínico STARS, que falhou em demonstrar benefício na administração combinada de sinvastatina e ativador do plasminogênio tecidual (tPA).(57)

Estabilizadores de membrana e fatores neurotróficos

A glibenclamida é um antagonista do recetor SUR1. Este recetor regula um canal de iões não seletivo, o NC(Ca-ATP), que é estimulado durante e após a lesão isquémica. A ativação deste canal, leva ao influxo de sódio e água para dentro das células, edema e morte celular por necrose.(58) Estudos animais confirmam a utilidade da glibenclamida na redução do edema celular e cerebral.(59) Um ensaio clínico de fase 2, o GAMES-RP (*The Glyburide Advantage in Malignant Edema and Stroke-Remedy Pharmaceuticals*), envolveu 86 pacientes e tinha como objetivo testar a eficácia e segurança da glibenclamida em pacientes com AVC isquémico e em alto risco de edema cerebral. Este estudo concluiu que a administração de glibenclamida é segura e, apesar de estatisticamente insignificante, resultou numa redução da mortalidade e edema cerebral. Estes resultados corroboram o potencial papel do recetor SUR1 na patogénese do edema cerebral isquémico.(60)

A citicolina é um precursor na síntese da fosfatidilcolina, um componente essencial das membranas celulares. Durante a lesão isquémica, a fosfatidilcolina é desfragmentada em ácidos gordos livres, que por sua vez são usados na formação de radicais livres, que contribuem para a lesão isquémica. Modelos animais demonstraram que a administração de citicolina reduz a desfragmentação da fosfatidilcolina e, por sua vez, a formação de ácidos gordos livres.(61) O ensaio clínico ICTUS foi um estudo randomizado, duplamente cego e controlado por placebo, com o envolvimento de 2298 pacientes com AVC moderado a severo, que demonstrou que a citicolina pode ser usada de forma segura, no entanto não é eficaz no tratamento do AVC isquémico moderado a severo.(62)

O Fiblast é uma proteína presente no cérebro adulto envolvido na regulação da sobrevivência e diferenciação de células e manutenção e proliferação de células da glia, endoteliais e outros tipos.(63) Estudos em modelos animais confirmam o efeito neuroprotetor com redução do volume de enfarte e melhores indicadores funcionais.(64) Um ensaio clínico duplamente cego comparou duas doses de Fiblast com placebo. O grupo com a dose baixa demonstrou uma tendência positiva não estatisticamente significativa, enquanto o grupo com a dose alta demonstrou uma tendência oposta, igualmente sem relevância estatística.(63)

O fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) corresponde a outro neurotrófico com potencial neuroprotetor. O G-CSF é uma glicoproteína com função de fator de crescimento responsável pela mobilização e diferenciação de células hematopoiéticas. Uma meta-análise de vários estudos em modelos animais concluiu que o G-CSF é um candidato promissor na redução do volume de enfarte e melhoria dos indicadores funcionais.(65) No entanto, apesar dos resultados promissores em modelos animais, um ensaio clínico com o envolvimento de 328 pacientes não demonstrou melhorias clínicas após 90 dias num regime de 3 dias de tratamento.(66)

Outras moléculas

A eritropoietina (EPO) tem efeitos neuroprotetores devido à sua ação anti-apoptótica, antioxidante, anti-inflamatória e neurotrófica. Os resultados de um ensaio clínico duplamente cego, controlado por placebo e randomizado teve, no entanto, resultados negativos, sendo que o indicador primário e outros várias não demonstraram benefício entre os dois grupos. Além disso, reportaram uma mortalidade aumentada no grupo da EPO.(67)

A cerebrolisina é um preparado de neuropéptidos de baixo peso molecular e aminoácidos de origem porcina, que demonstrou efeitos neuroprotetores em modelos animais. Os seus mecanismos de ação são pouco claros. Um ensaio clínico demonstrou que a administração da cerebrolisina é segura, no entanto não demonstrou diferenças significativas nos indicadores aos 90 dias.(68)

O cafeinol corresponde a uma combinação de cafeína e etanol. Esta terapêutica demonstrou neuroprotecção considerável quando usada em combinação, mas não em separado, sendo que o etanol até resultou em piores resultados.(69)

A cafeína atua principalmente via ação antagonista do recetor da adenosina, tendo a capacidade de aumentar a taxa metabólica para um mesmo fluxo sanguíneo, permitindo prolongar as vias metabólicas nas zonas de penumbra. O etanol atua principalmente através da estimulação de recetores GABA_A e inibição de recetores NMDA, contribuindo na promoção de vias antiexcitotóxicas.(70)

Um estudo piloto para determinação da dose, demonstrou a viabilidade e segurança da administração de cafeinol em combinação com trombólise endovascular.(71) Outro ensaio clínico demonstrou a viabilidade da combinação de trombólise intravenosa, hipotermia e cafeinol em pacientes acordados. No entanto, destacaram a dificuldade de alcançar a hipotermia devido à mão-de-obra intensiva e a gestão dos tremores. Além disso, identificaram um incidência de pneumonia nos pacientes tratados com hipotermia.(70)

Hipotermia

A utilidade da hipotermia como agente neuroprotetor tem sido demonstrada em modelos animais e estudos experimentais, considerado um dos neuroprotetores mais potentes.(72–74) Dois ensaios clínico já demonstraram a eficácia, utilidade e segurança da hipotermia como neuroprotetor na paragem cardíaca.(75,76)

Para testar a viabilidade e segurança deste procedimento, foram realizados dois estudos pilotos intitulados de COOL-AID (*The Cooling for Acute Ischemic Brain Damage*). O primeiro estudo utilizou arrefecimento externo e o segundo arrefecimento endovascular. Ambos os estudos demonstraram a viabilidade destes procedimentos, e apesar dos indicadores serem favoráveis, o número limitado de doentes não permitiu tirar conclusões em relação à eficácia.(77,78)

Os ensaios clínicos ICTuS foram três ensaios clínicos que avaliaram a viabilidade, segurança e eficácia da hipotermia por arrefecimento endovascular. O ICTuS e o ICTuS-L demonstraram a segurança e a viabilidade do arrefecimento endovascular associado a trombólise intravenosa.(79,80) O ICTuS-2 foi terminado precocemente devido a mudanças significativas no *standard care* do AVC. Devido a um número insuficiente de pacientes, o estudo não tinha potência suficiente para detetar qualquer tendência significativa.(81)

Ensaio clínico em curso

Diversos estudos e ensaios clínicos estão atualmente em curso ou em fase de recrutamento. Vários ensaios clínicos em andamento estão a averiguar a potencial utilidade do verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio, como neuroprotetor. Um ensaio de fase 1 iniciado em 2017 tem como objetivo averiguar a segurança de um procedimento intitulado administração de intra-arterial de verapamil. Outro ensaio iniciado em 2016 vai testar a segurança e viabilidade da combinação de verapamil com sulfato de magnésio, administrados intra arterialmente. Por fim, um ensaio concluído em 2017, pelo mesmo autor, testou a administração super seletiva de verapamil após trombólise intra-arterial. No entanto, os resultados ainda não foram publicados.(82–84)

Diversos ensaios clínicos estão igualmente a ser realizados na área de condicionamento isquémico. Esta técnica corresponde à aplicação de ciclos de isquemia breve seguidos de

reperfusão de um membro, utilizando uma braçadeira. Pode ser realizado antes, durante e após o evento isquêmico.(85)

O ensaio clínico de fase 1 REVISE-1 foi concluído em 2017 e tinha como objetivo avaliar a segurança e viabilidade da aplicação de condicionamento isquêmico remoto em combinação com tratamento endovascular. Os autores concluíram que esta técnica é segura e viável em doentes com AVC.(86) Dois ensaios clínicos encontram-se atualmente em andamento, o REMOTE-CAT e o RESIST com data prevista de finalização em 2022 e 2024, respetivamente. Ambos os estudos tem como objetivo avaliar a segurança e testar a hipótese de que o condicionamento isquêmico remoto vai levar a melhorias significativas em pacientes com AVC.(87,88)

Um dos contribuintes para a patogénese durante o AVC isquémico são os valores elevados de glutamato em circulação. De modo a mitigar os efeitos do glutamato, dois ensaios clínicos estão a ser realizados de modo a testar duas técnicas distintas. Um ensaio clínico com início esperado em 2020 vai avaliar a segurança e viabilidade da utilização de hemodiálise durante o AVC de modo a reduzir os níveis de glutamato e citocinas inflamatórias no sangue.(89) Outro estudo concluído, mas sem resultados publicados, avaliou a segurança da utilização de hemodiluição com o objetivo de diminuir os níveis de glutamato. Os resultados ainda não foram publicados.(90) Por fim, um ensaio clínico de fase 2 com data estimada de conclusão em 2021 está a testar a eficácia e avaliar os efeitos adversos da administração de ketamina na redução da neurotoxicidade.(91)

A estimulação transcraniana direta de corrente é uma área que também tem recebido alguma atenção. Um ensaio clínico iniciado em 2019 vai testar a viabilidade, a segurança e possivelmente a eficácia da aplicação de estimulação transcraniana direta antes e após trombectomia. O estudo tem data prevista de conclusão em 2022.(92)

Conclusão

Além de ser a segunda maior causa de mortalidade no mundo, e a primeira em Portugal, o AVC é também a segunda maior causa de morbidade, o que contribui para um gasto acrescido para o sistema de saúde, e uma mudança significativa para a qualidade de vida dos pacientes e dos seus cuidadores. É, assim, clara a importância da procura de novas estratégias terapêuticas e preventivas na abordagem ao AVC.

Desde os anos 90 que a procura de novas estratégias tem vindo a aumentar e diversos estudos tem sido realizados para testar novas substâncias e intervenções. No entanto, atualmente a abordagem aguda ao AVC está focada principalmente em abordagens e estratégias de reperfusão sanguínea. As *guidelines* internacionais mais recentes somente recomendam duas estratégias de reperfusão, a trombólise intravenosa e a trombectomia mecânica.

Vários estudos já comprovaram os benefícios destas duas intervenções, contudo os inúmeros critérios de elegibilidade levam a que somente uma pequena percentagem dos pacientes com AVC sejam de facto selecionados. No caso da trombólise intravenosa, somente 5.9% dos pacientes são incluídos, e na trombectomia mecânica, somente 10%.^(93,94) Além disso, ambas as intervenções apresentam inúmeras complicações, sendo a hemorragia intracerebral uma das principais.

Tendo isto em conta, a procura de novas terapias e intervenções é importante, pois não só vai permitir aumentar as janelas terapêuticas das intervenções já existentes, mas também abre a possibilidade de serem introduzidas terapias inovadoras.

Muitos fármacos neuroprotetores já foram testados em modelos animais e dezenas deles apresentaram efeitos positivos e promissores. No entanto, a passagem dos modelos animal experimental para ensaios clínicos em pacientes tem demonstrado resultados insatisfatórios. Várias razões têm sido propostas para explicar este insucesso.

A primeira prende-se com os modelos animais em si. A capacidade de resposta e tolerância ao evento isquémico difere entre espécies. Além disso, os animais usados são normalmente jovens e saudáveis, o que não representa as características dos doentes que normalmente sofrem um AVC.⁽⁹⁵⁾

Para mais, a monitorização dos diferentes parâmetros fisiológicos é importante, pois todos estes diferentes fatores e as suas variações tanto podem ter efeitos neuroprotetores como prejudiciais. Sendo assim, é importante ter em conta se o efeito da substância em estudo não foi afetada por parâmetros fisiológicos alterados⁽⁹⁵⁾

Outro fator importante corresponde à área e localização do enfarte. Enquanto nos modelos animais a isquemia é normalmente restrita ao córtex, o AVC isquêmico em humanos frequentemente envolve a substância branca. Esta última está associada a piores indicadores devido à inferior vascularização das zonas mais profundas.(95)

Por fim, outros fatores importantes estão relacionados com o grau de penetração da substância no SNC e a janela terapêutica. Devido à dificuldade de medir a concentração da substância que chega ao SNC, muitos dos estudos em modelos animais não aborda este aspeto. Além disso, um fator muito importante na administração de terapias neuroprotetoras corresponde à janela terapêutica. Nos modelos animais, a substância é administrada antes ou imediatamente após o evento isquêmico. No entanto, na realidade sabemos que um grande número de pacientes chega às unidades de AVC já para lá do período onde os efeitos são mais eficazes.(95)

Concluindo, na minha opinião a neuroproteção no AVC ainda apresenta muitos obstáculos. Novos estudos a ser realizados no futuro devem ser estruturados de modo a seguir as *guidelines* e a metodologia correta. Os modelos animais devem ser otimizados de modo a melhor mimetizar a fisiopatologia do AVC em humanos e melhor avaliar os resultados quer a curto e a longo prazo.

Apesar das dificuldades e da ausência de qualquer terapia neuroprotetora recomendada nas *guidelines* internacionais, acredito que no futuro seja possível a introdução de novas terapias e substâncias eficazes. Terapias previamente estudadas e sem benefícios significativos comprovados, podem ter um efeito mais significativo quando combinados com outras substâncias neuroprotetoras. Além disso, a introdução de edaravone em 2004 nas *guidelines* japonesas é um sinal promissor de que, no futuro, a neuroproteção poderá ser implementada internacionalmente.

Bibliografia

1. Johnson CO, Nguyen M, Roth GA, Nichols E, Alam T, Abate D, et al. Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(5):439–58.
2. Instituto Nacional de Estadística. Causas de muerte 2018. 2020;1–10.
3. Aho K, Harmsen P, Hatano S, Marquardsen J, Smirnov VE, Strasser T. Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study. *Bull World Health Organ.* 1980;58(1):113–30.
4. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2019;50(12):e344–418.
5. Kamalian S, H. Lev M. Stroke Imaging. *Radiol Clin North Am.* 2019;57(4):717–32.
6. Zerna C, Thomalla G, Campbell BC V, Rha J-H, Hill MD. Current practice and future directions in the diagnosis and acute treatment of ischaemic stroke. *Lancet* [Internet]. 2018 Oct 6;392(10154):1247–56. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31874-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31874-9)
7. Jameson JL, S. Fauci A, L. Kasper D, L. Hauser S, L. Longo D, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. 20th ed. 2019. 3068–3079 p.
8. J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo JL. Harrison's Principles of Internal Medicine, 20th edition. 20th ed. J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo JL, editor. McGraw-Hill; 2019.
9. Mokin M, Ansari SA, McTaggart RA, Bulsara KR, Goyal M, Chen M, et al. Indications for thrombectomy in acute ischemic stroke from emergent large vessel occlusion (ELVO): Report of the SNIS Standards and Guidelines Committee. *J Neurointerv Surg.* 2019;11(3):215–20.
10. Saver JL, Starkman S, Eckstein M, Stratton SJ, Pratt FD, Hamilton S, et al. Prehospital use of magnesium sulfate as neuroprotection in acute stroke. *N Engl J Med.* 2015;372(6):528–36.
11. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of Neuronal Protection against

- Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
12. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):779–89.
 13. Jablonska A, Lukomska B. Stroke induced brain changes: Implications for stem cell transplantation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):74–85.
 14. Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK. Oxidative stress - Assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol*. 2012;50(3):219–30.
 15. Daneman R, Prat A. *The Blood-Brain Barrier*. Cold Spring Harb Lab Press. 2015;3(5):510–4.
 16. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2019;316(2):C135–53.
 17. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(5).
 18. Nabavi SF, Sureda A, Sanches-Silva A, Pandima Devi K, Ahmed T, Shahid M, et al. Novel therapeutic strategies for stroke: The role of autophagy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2019;56(3):182–99.
 19. Wei K, Wang P, Miao CY. A Double-Edged Sword with Therapeutic Potential: An Updated Role of Autophagy in Ischemic Cerebral Injury. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18(11):879–86.
 20. Hara H, Kogure NK. Effect and of Nimodipine Mortality on Ischemia-Induced Transient Middle Model Edema in a Novel Artery Cerebral Occlusion tality after reperfusion using a novel transient MCA occlusion model . The effect of hyper osmotics (glycerol) on brain edema was al. *Dep Neurol Inst Brain Dis Tohoku Univ Sch Med*. 1990;247–53.
 21. Gelmers HJ, Gorter K, Weerdt CJ de, Wiezer HJA. A Controlled Trial of Nimodipine in Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 1988;318(4):203–7.
 22. Horn J, Limburg M. Calcium antagonists for ischemic stroke: A systematic review. *Stroke*. 2001;32(2):570–6.
 23. Lenzi GL, Grigoletto F, Gent M, Roberts RS, Walker MD, Donald Easton J, et al. Early treatment of stroke with monosialoganglioside GM-1: Efficacy and safety results of

- the early stroke trial. *Stroke*. 1994;25(8):1552–8.
24. Grotta JC, Albers GW, Broderick JP, Kasner SE, Lo EH, Mendelow AD, et al. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. In: 6th ed. Elsevier Inc.; 2016. p. 916–32.
 25. Davis SM, Lees KR, Albers GW, Diener HC, Markabi S, Karlsson G, et al. Selfotel in acute ischemic stroke: Possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke*. 2000;31(2):347–54.
 26. Simon R, Shiraishi K. N-Methyl-D-Aspartate antagonist reduces stroke size and regional glucose metabolism. *Ann Neurol*. 1990;27(6):606–11.
 27. Grotta JC, Picone CM, Ostrow PT, Strong RA, Earls RM, Yao LP, et al. CGS-19755, A competitive NMDA receptor antagonist, reduces calcium-calmodulin binding and improves outcome after global cerebral ischemia. *Ann Neurol*. 1990;27(6):612–9.
 28. Albers GW, Goldstein LB, Hall D, Lesko LM. Aptiganel Hydrochloride in Acute Ischemic Stroke. 2015;286(21):2673–82.
 29. Meadows ME, Fisher M, Minematsu K. Delayed treatment with a noncompetitive NMDA antagonist, CNS-1102, reduces infarct size in rats. *Cerebrovasc Dis*. 1994;4(1):26–31.
 30. Saver JL, Starkman S. *Magnesium in the Central Nervous System: Magnesium in clinical stroke*. Univ Adelaide. 2011;
 31. Bordi F, Pietra C, Ziviani L, Reggiani A. The glycine antagonist GV150526 protects somatosensory evoked potentials and reduces the infarct area in the mcao model of focal ischemia in the rat. *Exp Neurol*. 1997;145(2 I):425–33.
 32. Derosa JT, Haley EC, Levin B, Ordronneau P, Phillips SJ, Snipes RG, et al. Glycine Antagonist in Neuroprotection. 2001;285(13):1719–28.
 33. Elting JW, Sulter GA, Kaste M, Lees KR, Diener HC, Hommel M, et al. AMPA antagonist ZK200775 in patients with acute ischemic stroke: Possible glial cell toxicity detected by monitoring of S-100B serum levels. *Stroke*. 2002;33(12):2813–8.
 34. Lyden P, Shuaib A, Ng K, Levin K, Atkinson RP, Rajput A, et al. Clomethiazole acute stroke study in ischemic stroke (CLASS-I): Final results. *Stroke*. 2002;33(1):122–8.
 35. Hall ED, Pazara KE, Mark Braughler J. 21-Aminosteroid Lipid Peroxidation Inhibitor U74006F Protects Against Cerebral Ischemia in Gerbils. *Stroke*. 1988;19(8):997–

1002.

36. Tirilazad International Steering Committee. Tirilazad Mesylate in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2000;31(9):2257–65.
37. Dawson DA, Masayasu H, Graham DI, Macrae IM. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci Lett*. 1995;185(1):65–9.
38. Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, Asano T, et al. Ebselen in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 1998;29(1):12–7.
39. Otomo E, Tohgi H, Kogure K, Hirai S, Takakura K, Terashi A, et al. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction: Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis*. 2003;15(3):222–9.
40. Shinohara Y, Yamaguchi T. Outline of the Japanese guidelines for the management of stroke 2004 and subsequent revision. *Int J Stroke*. 2008;3(1):55–62.
41. Kuroda S, Tsuchidate R, Smith ML, Maples KR, Siesjö BK. Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(7):778–87.
42. Davalos A, Davis SM, Diener H, Grotta J, Lyden P, Shuaib A, et al. NXY-059 for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2006;354(6):588–600.
43. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, et al. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2007;357(6):562–71.
44. Sherman D, Bes A, Easton JD, Hacke W, Kaste M, Polmar SH, et al. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: Results of the enlimomab acute stroke trial. *Neurology*. 2001;57(8):1428–34.
45. Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA. Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule. *J Neurosurg*. 1991;75(4):623–7.
46. Becker KJ. Anti-leukocyte antibodies: LeukArrest (Hu23F2G) and enlimomab (R6.5) in acute stroke. *Curr Med Res Opin*. 2002;18(SUPPL. 2).
47. Jiang N, Chopp M, Chahwala S. Neutrophil inhibitory factor treatment of focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*. 1998;788(1–2):25–34.
48. Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA. Acute Stroke

- Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN): An Adaptive Dose-Response Study of UK-279,276 in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2003;34(11):2543–8.
49. Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13496–500.
 50. Lampl Y, Boaz M, Gilad R, Lorberboym M, Dabby R, Rapoport A, et al. Minocycline treatment in acute stroke: An open-label, evaluator-blinded study. *Neurology*. 2007;69(14):1404–10.
 51. Qizilbash N, Lewington S, Lopez-Arrieta J. Corticosteroids for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(3).
 52. Belayev L, Liu Y, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. Human albumin therapy of acute ischemic stroke: Marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke*. 2001;32(2):553–60.
 53. Hill MD, Martin RH, Palesch YY, Tamariz D, Waldman BD, Ryckborst KJ, et al. The albumin in acute stroke part 1 trial: An exploratory efficacy analysis. *Stroke*. 2011;42(6):1621–5.
 54. Ginsberg MD, Palesch YY, Hill MD, Martin RH, Moy CS, Barsan WG, et al. High-dose albumin treatment for acute ischaemic stroke (ALIAS) part 2: A randomised, double-blind, phase 3, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* [Internet]. 2013;12(11):1049–58. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70223-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70223-0)
 55. García-Bonilla L, Campos M, Giralt D, Salat D, Chacón P, Hernández-Guillamon M, et al. Evidence for the efficacy of statins in animal stroke models: A meta-analysis. *J Neurochem*. 2012;122(2):233–43.
 56. Yoshimura S, Uchida K, Daimon T, Takashima R, Kimura K, Morimoto T, et al. Randomized controlled trial of early versus delayed statin therapy in patients with acute ischemic stroke: ASSORT trial (administration of statin on acute ischemic stroke patient). *Stroke*. 2017;48(11):3057–63.
 57. Montaner J, Bustamante A, García-Matas S, Martínez-Zabaleta M, Jiménez C, De La Torre J, et al. Combination of thrombolysis and statins in acute stroke is safe: Results of the STARS randomized trial (Stroke Treatment With Acute Reperfusion and Simvastatin). *Stroke*. 2016;47(11):2870–3.
 58. Sheth KN, Kimberly WT, Elm JJ, Kent TA, Mandava P, Yoo AJ, et al. Pilot study of

- intravenous glyburide in patients with a large ischemic stroke. *Stroke*. 2014;45(1):281–3.
59. Marc Simard J, Yurovsky V, Tsymbalyuk N, Melnichenko L, Ivanova S, Gerzanich V. Protective effect of delayed treatment with low-dose glibenclamide in three models of ischemic stroke. *Stroke*. 2009;40(2):604–9.
 60. Sheth KN, Elm JJ, Molyneaux BJ, Hinson H, Beslow LA, Sze GK, et al. Safety and efficacy of intravenous glyburide on brain swelling after large hemispheric infarction (GAMES-RP): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Neurol* [Internet]. 2016;15(11):1160–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30196-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30196-X)
 61. Trovarelli G, De Medio GE, Dorman R V., Piccinin GL, Horrocks LA, Porcellati G. Effect of cytidine diphosphate choline (CDP-choline) on ischemia-induced alterations of brain lipid in the gerbil. *Neurochem Res*. 1981;6(8):821–33.
 62. Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Castillo J, Díez-Tejedor E, Ferro J, Martínez-Vila E, et al. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: An international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet* [Internet]. 2012;380(9839):349–57. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60813-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60813-7)
 63. Bogousslavsky J, Victor SJ, Salinas EO, Pallay A, Donnan GA, Fieschi C, et al. Fiblast (Trafermin) in acute stroke: Results of the european-australian phase II/III safety and efficacy trial. *Cerebrovasc Dis*. 2002;14(3–4):239–51.
 64. Fisher M, Meadows ME, Do T, Weise J, Trubetskoy V, Charette M, et al. Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15(6):953–9.
 65. Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schabitz WR. Meta-analysis of the efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2008;39(6):1855–61.
 66. Ringelstein EB, Thijs V, Norrving B, Chamorro A, Aichner F, Grond M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute ischemic stroke results of the Ax200 for ischemic stroke trial. *Stroke*. 2013;44(10):2681–7.
 67. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke.

- Stroke. 2009;40(12).
68. Lang W, Stadler CH, Poljakovic Z, Fleet D, Willeit J, Brainin M, et al. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind trial about safety and efficacy of combined treatment with alteplase (rt-PA) and Cerebrolysin in acute ischaemic hemispheric stroke. *Int J Stroke*. 2013;8(2):95–104.
 69. Strong R, Grotta JC, Aronowski J. Combination of low dose ethanol and caffeine protects brain from damage produced by focal ischemia in rats. *Neuropharmacology*. 2000;39(3):515–22.
 70. Martin-Schild S, Halleivi H, Shaltoni H, Barreto AD, Gonzales NR, Aronowski J, et al. Combined Neuroprotective Modalities Coupled with Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke: A Pilot Study of Caffeinol and Mild Hypothermia. *J Stroke Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2009;18(2):86–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.09.015>
 71. Piriyaawat P, Labiche LA, Burgin WS, Aronowski JA, Grotta JC. Pilot dose-escalation study of caffeine plus ethanol (caffeinol) in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34(5):1242–5.
 72. Popovic R, Liniger R, Bickler PE. Anesthetics and mild hypothermia similarly prevent hippocampal neuron death in an in vitro model of cerebral ischemia. *Anesthesiology*. 2000;92(5):1343–9.
 73. Buchan A, Pulsinelli WA. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci*. 1990;10(1):311–6.
 74. Barone FC, Feuerstein GZ, White RF. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21(1):31–44.
 75. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med*. 2002;346(8):557–63.
 76. Holzer M, Sterz F, Darby JM, Padosch SA, Kern KB, Böttiger BW, et al. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med*. 2002;346(8):549–56.
 77. Krieger DW, De Georgia MA, Abou-Chebl A, Andrefsky JC, Sila CA, Katzan IL, et al. Cooling for acute ischemic brain damage (COOL AID): An open pilot study of induced hypothermia in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2001;32(8):1847–54.

78. De Georgia MA, Krieger DW, Abou-Chebl A, Devlin TG, Jauss M, Davis SM, et al. Cooling for acute ischemic brain damage (COOL AID): A feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology*. 2004;63(2):312–7.
79. Lyden PD, Allgren RL, Ng K, Akins P, Meyer B, Al-Sanani F, et al. Intravascular cooling in the treatment of stroke (ICTuS): Early clinical experience. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2005;14(3):107–14.
80. Hemmen TM, Raman R, Guluma KZ, Meyer BC, Gomes JA, Cruz-Flores S, et al. Intravenous Thrombolysis Plus Hypothermia for Acute Treatment of Ischemic Stroke (ICTuS-L): Final results. *Stroke*. 2010;41(10):2265–70.
81. Lyden P, Hemmen T, Grotta J, Rapp K, Ernstrom K, Rzesiewicz T, et al. Results of the ICTuS 2 Trial (Intravascular Cooling in the Treatment of Stroke 2). *Stroke*. 2016;47(12):2888–95.
82. Veznedaroglu E. Verapamil for Neuroprotection in Stroke [Internet]. Global Neurosciences Institute. 2017. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03347786>
83. Fraser J. Magnesium And Verapamil After Recanalization in Ischemia of the Cerebrum: a Clinical and Translational Study. (MAVARIC) [Internet]. 2017. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02912663>
84. Fraser J. Superselective Administration of VERapamil During Recanalization in Acute Ischemic Stroke (SAVER-I) [Internet]. 2013. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02235558>
85. Landman TRJ, Schoon Y, Warlé MC, De Leeuw FE, Thijssen DHJ. Remote Ischemic Conditioning as an Additional Treatment for Acute Ischemic Stroke: The Preclinical and Clinical Evidence. *Stroke*. 2019;50(7):1934–9.
86. Zhao W, Che R, Li S, Ren C, Li C, Wu C, et al. Remote ischemic conditioning for acute stroke patients treated with thrombectomy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018;5(7):850–6.
87. Purroy F. Ischemic Perconditioning Among Acute Ischemic Stroke Patients (REMOTE-CAT) [Internet]. Institut de Recerca Biomèdica de Lleida Collaborator. 2019. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03375762>
88. Andersen G. Remote Ischemic Conditioning in Patients With Acute Stroke (RESIST) [Internet]. 2018. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03481777>

89. Feasibility and Safety Study to Evaluate the Neuroprotective Effect of Hemodialysis in Acute Ischemic Stroke (DIAGLUICTUS2) [Internet]. 2020. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04297345>
90. Viderman D. Hemofiltration in Acute Ischemic Stroke (HAISM) [Internet]. 2014. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03454867>
91. Aggarwal S. Quelling of Excitotoxicity in Acute Stroke With Ketamine (QUEST-KETA) [Internet]. 2020. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03223220>
92. Hosseini MB. Transcranial Direct Current Stimulation as a Neuroprotection in Acute Stroke Before and After Thrombectomy (TESSERACT-BA) [Internet]. 2019. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04061577>
93. De Los Ríos La Rosa F, Khoury J, Kissela BM, Flaherty ML, Alwell K, Moomaw CJ, et al. Eligibility for intravenous recombinant tissue-type plasminogen activator within a population: The effect of the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) III trial. *Stroke*. 2012;43(6):1591–5.
94. McMeekin P, White P, James MA, Price CI, Flynn D, Ford GA. Estimating the number of UK stroke patients eligible for endovascular thrombectomy. *Eur Stroke J*. 2017;2(4):319–26.
95. Xu SY, Pan SY. The failure of animal models of neuroprotection in acute ischemic stroke to translate to clinical efficacy. *Med Sci Monit Basic Res*. 2013;19:37–45.