

LETÍCIA MARTIMIANO FERREIRA

NEURODEGENERAÇÃO PROMOVIDA PELO HEME EM
MODELO DE INJEÇÃO INTRACEREBRAL



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO DE 2018**

Trabalho realizado no Laboratório de Imunidade e Inflamação do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Marcelo Torres Bozza e co-orientação de Luiz Ricardo da Costa Vasconcellos.

M345n Martimiano Ferreira , Leticia
 Neurodegeneração promovida pelo Heme em modelo de
Injeção Intracerebral / Leticia Martimiano Ferreira
. -- Rio de Janeiro, 2018.
 76 f.

 Orientador: Marcelo Torres Bozza.
 Coorientador: Luiz Ricardo da Costa Vasconcellos.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2018.

 1. Heme. 2. Neuroinflamação . 3. Neurodegeneração.
4. Hemorragia Intracerebral. I. Torres Bozza,
Marcelo, orient. II. Ricardo da Costa Vasconcellos,
Luiz, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Letícia Martimiano Ferreira**
DRE: 115061389

BANCA EXAMINADORA: Profa. Iranaiá Assunção Miranda (Presidente)
Prof. Fabiano Ferreira Dutra
Dra. Gabriele Vargas Cesar
Profa. Juliana Echevarria Lima (Suplente)

Título da Monografia: **“Neurodegeneração promovida pelo Heme em modelo de injeção intracerebral”**

Local: **Sala D-27 / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ**
Data e hora de início: **7 de dezembro de 2018 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,8 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 07 de Novembro de 2018.

NOTA
9,8

9,5

10,0

Banca Examinadora:

Iranaiá Assunção Miranda
Profa. Iranaiá Assunção Miranda

Fabiano Ferreira Dutra
Prof. Fabiano Ferreira Dutra

Gabriele Vargas Cesar
Dra. Gabriele Vargas Cesar

Juliana Echevarria Lima
Profa. Juliana Echevarria Lima

Aluno:

Letícia Martimiano Ferreira
Letícia Martimiano Ferreira

Orientador:

Marcelo Torres Bozza
Prof. Marcelo Torres Bozza

Coorientador:

Luz Ricardo da Costa Vasconcelos
Dr. Luz Ricardo da Costa Vasconcelos

Coordenador
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Aos meus pais, por todo amor e suporte.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por estar comigo em todas as situações, me guiando e protegendo, fornecendo conforto quando a saudade da família quis bater mais forte, me tranquilizando nos momentos de angústia e possibilitando muitos momentos de alegria. A Ele sou e sempre serei grata por cada realização.

Também agradeço meus pais, Zilá e Francisco, que fizeram possível a realização desse sonho, sem o esforço de vocês eu não estaria onde estou. Obrigada por sempre confiarem em mim e nunca desacreditarem do que sou capaz. Vocês são meu orgulho e minha base, serei eternamente grata a vocês.

Gu, meu irmão, obrigada por todo apoio, sei que posso contar sempre com você. Regiane e Péricles meus queridos tios, agradeço especialmente a vocês por acreditarem em mim e dar todo suporte a minha vinda ao Rio, vocês fazem parte dessa conquista.

Agradeço também a minha amiga Letícia, que esteve comigo em todos os momentos, dos melhores aos piores. Lê, obrigada por todo companherismo, morar em república foi uma experiência única e sou grata por ter desfrutado dela com você. Também quero agradecer a minha querida Toninha, uma das pessoas mais iluminadas que já conheci. Você foi um dos melhores presentes que o Rio me deu e tenho certeza que vou levar pra vida todinha. Também agradeço as minhas amigas de longa data Jady e Bia, que mesmo com toda distância sempre deram um jeitinho de estarem presentes na minha vida. Obrigada por todo apoio meninas.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores Marcelo e Luiz por ajudarem na minha formação. Luiz, além de me coorientar por todo esse ano, você se tornou meu amigo, obrigada pelos aprendizados, pelas conversas e por todas as risadas. Amei trabalhar com você e espero continuar trabalhando. Também quero agradecer o Heitor, um homem incrível que admiro tanto. Heitor, meu querido “pai do Rio”, obrigada por cada conversa, conselho, ajuda e abraço, você sempre esteve disposto a me ajudar quando precisei. Obrigada a todos do laboratório, vocês se tornaram minha família do Rio, fizeram a rotina de trabalho ser muito mais divertida. Obrigada “Vini loiro” pela amizade e pela companhia na volta para casa, Elisa pela troca de conselhos e experiências de vida, Deza por cada risada, “Vini japa” por ser tão bonzinho e solícito, Filipe por toda ajuda nos experimentos, Dani por cada almoço maravilhoso, Rafa pela disposição de sempre me ajudar e pelos bolos maravilhosos, Fabianno pelos ensinamentos e Carol por todo apoio.

Também agradeço às amigas que fiz durante a graduação. Koba, menina de coração enorme, obrigada pela parceria durante esses anos. Rafa, por cada trabalho em grupo e cada momento divertido nas festas. Carol, por transmitir tranquilidade nos momentos difíceis. Sou muito grata por ter conhecido vocês.

Agradeço aos membros da banca por disponibilizarem seu tempo para avaliar e contribuir com meus resultados, e também as agências de fomento, CNPq e FAPERJ.

RESUMO

LETÍCIA MARTIMIANO FERREIRA

NEURODEGENERAÇÃO PROMOVIDA PELO HEME EM MODELO DE INJEÇÃO INTRACEREBRAL

Orientador: Marcelo Torres Bozza

Co-orientador: Luiz Ricardo da Costa Vasconcellos

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A Hemorragia Intracerebral (HI) é uma doença em que ocorre a ruptura espontânea de uma artéria causando a liberação maciça dos componentes sanguíneos para o parênquima cerebral, culminando em grande quantidade de hemácias, hemoglobina e, conseqüentemente, Heme livre na região acometida pelo evento hemorrágico. Essa patologia é responsável por milhões de mortes no mundo e até hoje ainda não existe nenhum tratamento efetivo após ocorrência, apenas a reabilitação fisioterápica. Dentre as moléculas liberadas na hemorragia, o Heme é o alvo desse estudo por já ter sido descrito como um indutor de estresse oxidativo e inflamação – marcas registradas na progressão de doenças neurodegenerativas. Na doença relatada, o Heme atua como grupamento prostético sendo encontrado inserido na Hemoglobina estando restrito ao ambiente intracelular em condições fisiológicas. Entretanto, em condições patológicas, como nos casos de hemorragia, ocorre à liberação de hemácias liberando Heme em grande quantidade podendo causar seus efeitos deletérios. Levando o exposto em consideração, este trabalho tem como objetivo avaliar o papel do Heme e dos seus mecanismos na neuroinflamação e neurodegeneração desencadeada na HI com o objetivo de vislumbrar novos alvos terapêuticos. Para este estudo foram utilizadas fêmeas C57black6 e foi realizada a injeção de Heme na região do “striatum” do cérebro dos animais, principal região responsável pelas funções motoras. Para estabelecer o modelo, foram utilizados cinco grupos que foram injetados com doses diferentes de Heme e, em adição, um grupo controle injetado com veículo. Com isso, foram analisados os efeitos da injeção a longo prazo, avaliando as funções sensório-motoras dos animais por testes como Body Swing, Rotarod, Cilindro, Corner e o teste do Pole como forma de avaliar o déficit induzido pela lesão da HI.

Além disso, foram avaliados parâmetros a curto prazo associados à lesão induzida na HI e a inflamação local. Dentre os resultados foi observada maior inflamação nos animais injetados com Heme, quando comparados ao controle, além disso, foi observada lesão nos cérebros dos animais injetados com heme, evidenciada através da coloração de Cresil. Já os resultados dos testes sensório- motores mostraram que os animais injetados com a maior dose de Heme demonstram uma assimetria após a injeção, e apresentaram déficits motores no Rotarod, e dificuldade em manter a coordenação motora no pole teste, quando comparado tanto aos testes anteriores à injeção quanto ao grupo controle. Portanto, esses resultados demonstram que a injeção de Heme pode ser utilizado para mimetizar os efeitos da HI e que pode atuar como componente mínimo e ter papel fundamental na neurodegeneração observada nesta doença.

Palavras-chave: Heme, neuroinflamação, neurodegeneração, hemorragia intracerebral.

ABSTRACT

LETÍCIA MARTIMIANO FERREIRA

NEURODEGENERATION PROMOTED BY HEME IN INTRACEREBRAL HEMORRHAGE MODEL

Advisor: Marcelo Torres Bozza

Co-advisor: Luiz Ricardo da Costa Vasconcello

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Intracerebral hemorrhage (ICH) is a disease in which spontaneous rupture of an artery causes the massive release of blood components to the cerebral parenchyma, culminating in large amounts of hemoglobin, hemoglobin and consequently free Heme in the region affected by the hemorrhagic event. This pathology is responsible for millions of deaths in the world and still this days there is no effective treatment after the event, only physical therapy rehabilitation. Among the molecules released in the hemorrhage, Heme is the target of this study because it has already been described as an inducer of oxidative stress and inflammation - registered marks in the progression of neurodegenerative diseases. Heme acts as a prosthetic group being found inserted in hemoglobin being restricted to the intracellular environment in physiological conditions. However in pathological conditions, as in cases of hemorrhage, the release of the blood components to the extracellular environment occurs, then, the red blood cells can undergo lysis during the process exposing their components, so Heme in high quantity is released in its free form being able to cause its deleterious effects. This study aims to evaluate the role of Heme and its mechanisms in neuroinflammation and neurodegeneration triggered in ICH and thus propose new therapeutic targets. For this study, C57black6 females were used and a model of ICH was developed by injecting Heme in the striatum region of the animals' brains, the main region responsible for motor functions. To establish the model, five groups were used that were injected with different doses of Heme and, in addition, a control group injected with vehicle. Thus, the effects of long-term injection were analyzed by evaluating the sensory-motor functions of the animals by tests such as Body Swing, Rotarod, Cylinder, Corner and the Pole test as a way of assessing the deficit induced by ICH injury. In addition, short-term parameters associated with induced injury in ICH and local inflammation

were evaluated. Among the results, higher inflammation was observed in the animals injected with Heme, when compared to the control, in addition, the animals' brains presented lesion, observed through the staining of Cresil. The results of sensory-motor tests showed that animals injected with the highest Heme dose demonstrated an asymmetry after injection and had motor deficits in Rotarod, and difficulty in maintaining motor coordination in the pole test when compared to both tests prior to injection in the control group. Therefore, these results demonstrate that Heme injection is a good model for ICH and that it can act as a minimal component and play a fundamental role in the neurodegeneration observed in this disease.

Key-words: Heme, neuroinflammation, neurodegeneration, intracerebral hemorrhage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de acidente vascular encefálico: hemorrágico e isquêmico.....	3
Figura 2. Principais causas de óbito no mundo.....	4
Figura 3. Estrutura do Heme (Ferro-Protoporfirina IX)	13
Figura 4. Mecanismos de defesa contra o heme livre.....	18
Figura 5. Imagem frontal do cérebro de camundongos com a região do <i>Striatum</i> destacada..	24
Figura 6. Procedimento cirúrgico para indução da hemorragia intracerebral.....	25
Figura 7. Cronograma dos testes sensório-motores.....	25
Figura 8. Rotarod.....	26
Figura 9. Movimento de elevação corporal dos camundongos.....	27
Figura 10. Teste do Cilindro.....	28
Figura 11. Corner.....	29
Figura 12. Teste do Pole.....	30
Figura 13. Estrutura molecular do heme e da protoporfirina.....	33
Figura 14. Liberação de citocinas 24h após a injeção de heme.....	34
Figura 15. Análise histológica pela coloração de Cresil 24 horas após injeção de heme.....	36
Figura 16. Avaliação da função motora dos animais pelo teste Rotarod.....	38
Figura 17. Avaliação da assimetria dos animais pelo teste Body Swing.....	40
Figura 18. Avaliação da assimetria dos animais pelo teste do Cilindro.....	42
Figura 19. Avaliação da assimetria dos animais pelo teste do Corner.....	43
Figura 20. Avaliação da função motora dos animais pelo teste do Pole.....	45
Figura 21. Análise histológica pela coloração de Cresil após 16 dias de cirurgia.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Célula apresentadora de antígeno

AVE - Acidente vascular encefálico

BSA - Albumina de soro bovino

C57BL/6 - Linhagem de camundongo C57 black 6

CCS - Centro de ciências da saúde

CD4 - Cluster de diferenciação 4

CD91 - Receptor para proteína de choque térmico gp96

CXCL12 - Fator precursor 1 derivado de célula estromal

CXCL8 - Quimiocina motivo ligante 8

DAMP - Padrões moleculares associados ao dano

EUA - Estados Unidos da América

Fe - Ferro

Fe²⁺ - Ferroso

Fe³⁺ - Férrico

HCl – Ácido clorídrico

HDL - *High density lipoprotein*

HI - Hemorragia Intracerebral

HO - Heme oxigenase

HO-1- Heme oxigenase 1

HO-2 - Heme oxigenase 2

IL-10 - Interleucina 10

IL-6 - Interleucina 6

IMPG - Instituto de Microbiologia Paulo de Goes

IL-1 β - Interleucina 1 β

NaOH - Hidróxido de sódio

NK - *Natural Killer*

NLRP3 - Domínio contendo proteína 3 de receptor rico em Leucina e Pirina

O₂ - Oxigênio

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PKC - Proteína quinase C

PPIX - Protoporfirina IX

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SNC - Sistema nervoso central

T.A - Temperatura ambiente

TLR - *Toll like receptor*

TLR4 – *Toll like receptor 4*

TMB - *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*

TNF - Fator de necrose tumoral

Sumário

1. Introdução	3
1.1 Acidente Vascular Encefálico (AVE)	3
1.2 Hemorragia Intracerebral (HI).....	4
1.2.1 Fatores de Risco.....	5
1.2.2 Fisiopatologia da Hemorragia Intracerebral	6
1.3 Neuroinflamação induzida na HI	8
1.4 Heme	13
1.4.1 Citotoxicidade do Heme	14
1.4.2 Controle do Heme na forma livre	16
1.4.3 Heme e Neurodegeneração.....	19
2. Justificativa	21
3. Objetivo.....	22
3.1 Objetivos específicos.....	22
4. Material e Métodos	23
4.1 Animais	23
4.2 Preparo do Heme.....	23
4.3 Cirurgia	23
4.4 Análise Comportamental.....	25
4.4.1 Rotarod.....	26
4.4.2 Body Swing	27
4.4.3 Cilindro	27
4.4.4 Corner.....	28
4.4.5 Pole Teste	29
4.5 Retirada dos cérebros	30
4.6 Análise Histológica	31
4.6.1 Aquisição dos cortes.....	31
4.6.2 Preparo das lâminas.....	31

4.6.3	Coloração de Cresil	31
4.7	Microscopia.....	32
4.8	ELISA	32
4.9	Análise estatística.....	32
5.	Resultados	33
5.1	Efeitos inflamatórios 24 horas após a injeção de Heme.....	33
5.2	Análise histológica 24 horas após a injeção de Heme.....	35
5.3	Avaliação sensório-motora após a injeção de Heme.....	37
5.3.1	Rotarod	37
5.3.2	Body Swing	38
5.3.3	Cilindro.....	41
5.3.4	Corner.....	42
5.3.5	Pole Teste.....	44
5.4	Análise histológica 16 dias após a injeção de Heme.....	45
6.	Discussão	48
7.	Conclusão.....	54
8.	Referências Bibliográficas	55

1. Introdução

1.1 Acidente Vascular Encefálico (AVE)

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma doença cérebro-vascular que consiste em lesão no vaso sanguíneo que pode ser causada por distúrbios da coagulação ou hemodinâmicos. A lesão resulta em sinais e sintomas com duração superior a 24 horas, sendo eles bem variados, onde qualquer alteração neurológica súbita - como fraqueza de membros, dificuldade em andar, alterações visuais, tonturas e vertigens - pode ser consequência dessa doença (Nunes et al. 2005).

Aproximadamente 80% dos casos de AVE são causados devido à interrupção do fluxo sanguíneo, seja por ateroma ou por êmbolos secundários (Stokes, 2000). Esse bloqueio do fluxo sanguíneo priva determinada região do cérebro de nutrientes deixando-o incapacitado de realizar o metabolismo celular de forma eficiente, culminando assim em lesão e morte do tecido (Mazzola et al. 2007). Neste caso, o acidente vascular cerebral é caracterizado como isquêmico. O outro tipo de AVE é o hemorrágico, também chamado de Hemorragia Intracerebral (HI), no qual consiste de extravasamento de sangue de forma espontânea e aguda no interior do parênquima cerebral (Mayer e Rincon, 2005), causando aumento na pressão intracraniana que pode ocasionar lesões nos tecidos cerebrais e restringir o fluxo sanguíneo distal (O'Sullivan e Schmitz, 2004) (**Figura 1**).

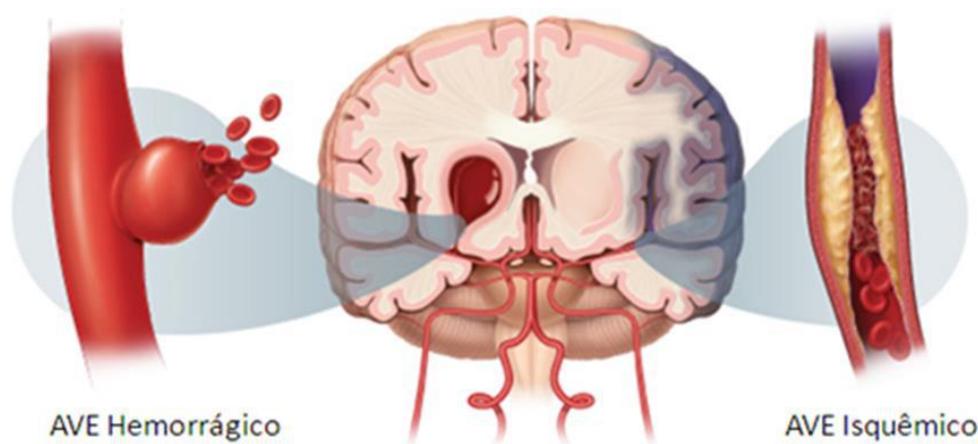


Figura 1. Tipos de acidente vascular encefálico: hemorrágico e isquêmico. O AVE hemorrágico consiste em extravasamento espontâneo e agudo de sangue para o interior do parênquima cerebral, enquanto que o AVE isquêmico se caracteriza pela interrupção do fluxo sanguíneo em determinada região do cérebro, privando-o de nutrientes e consequentemente afetando seu metabolismo. Adaptado de <http://fescenter.org/wp-content/uploads/2013/11/What-is-a-stroke.jpg>

Essa doença cérebro-vascular possui incidência anual de 10,3 milhões de novos casos. Nos países de baixa e média renda cerca de 75% dos casos resulta em morte e dos que sobrevivem, mais de 80% sofrem incapacidade funcional devido as sequelas e os déficits neurológicos que a doença ocasiona (Feigin et al. 2015, 2016). Esses 80% se tornaram dependentes de terceiros para a realização de suas atividades diárias, apresentando dificuldades em sustentar o peso no hemicorpo afetado, o que interfere no controle da postura, gerando dificuldades na realização dos movimentos do tronco e membros (Polese et al. 2008). A incidência da doença aumenta com a idade e dobra a cada década de vida após os 55 anos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam o AVE como a segunda principal causa de óbitos no mundo (**Figura 2**). O único tratamento realizado até o momento é a reabilitação fisioterápica após ocorrência, que nem sempre se mostra eficaz.



Figura 2. Principais causas de óbito no mundo. O AVE é segunda a maior causa de morte no mundo, sendo responsável por aproximadamente seis milhões de óbitos, ficando atrás apenas da cardiopatia isquêmica. Adaptado de OMS, 2016.

1.2 Hemorragia Intracerebral (HI)

Este trabalho estuda especificamente o AVE hemorrágico, também conhecido como hemorragia intracerebral, sendo o subtipo associado a maior taxa de mortalidade (cerca de 40% por mês) (Keep, Hua e Xi, 2014). Após HI, as taxas de casos fatais são cerca de 55% em um ano e 70% em cinco anos (Poon, Fonville e Al-Shahi, 2014). Os pacientes que sobrevivem

normalmente apresentam grandes deficiências neurológicas, onde apenas 20% desses indivíduos são capazes de recuperar a independência funcional seis meses após o evento hemorrágico (Fogelholm et al. 2005).

A HI é responsável por 10-30% de todas as internações por AVE nos hospitais (Qureshi et al. 2001). Nos EUA, Europa e Austrália, por exemplo, esse distúrbio é responsável por 10 a 15% de todos os derrames, já na Ásia, representa de 20 a 30%, tendo uma incidência de dois milhões de casos por ano no mundo (Sangha e Gonzales, 2011), sendo um grande problema de saúde pública global. O custo terapêutico médio diário do AVE é de US\$ 1,706.60 por paciente (Neves et al. 2002). No Brasil, as doenças cerebrovasculares não são consideradas agravos de notificação compulsória, portanto, os dados de morbidade e mortalidade em sua maioria são provenientes de registros hospitalares ou de formulários de autorização de internação em hospitais conveniados ao Sistema Único de Saúde (Pontes-neto et al. 2009). As estatísticas brasileiras existentes apontam o AVE como a causa mais frequente de óbito na população adulta, representando 10% dos casos, e consiste no diagnóstico de 10% das internações em hospitais públicos (Pontes-neto et al. 2009). A obtenção de dados precisos sobre a epidemiologia da HI é de extrema importância para poder realizar a alocação de recursos necessários, fornecer orçamentos de pesquisa e estratégias de tratamento e reabilitação, de forma a melhorar os resultados e terapias dessa doença tão grave.

1.2.1 Fatores de Risco

Os fatores de risco para a HI podem ser tanto não modificáveis – envolvendo fatores genéticos que não podem ser alterados, quanto modificáveis – responsáveis por 90% dos casos sendo aqueles relacionados com hábitos de vida que quando tratados, diminuem a incidência em mais de 75%, apenas pelo controle desses fatores (Feigin et al. 2015). Dentre os mais comuns considerados não modificáveis estão: idade avançada, raça, etnia e gênero (Qureshi et al. 2001). A idade é considerada o fator de risco mais importante para a HI, como dito anteriormente, a cada década de avanço a partir dos 50 anos se associa um aumento de duas vezes na incidência da doença (Adeoye e Broderick, 2010). Um estudo realizado pela Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição demonstrou que em 20 anos a incidência de hemorragia intracerebral entre negros foi de 50 a cada 100 mil – duas vezes a incidência da doença entre os brancos. Diferenças na prevalência de hipertensão e no nível de escolaridade

correlacionaram-se com essa diferença de risco, onde o risco aumentado associado a baixos níveis de educação podem estar relacionados à falta de conscientização sobre prevenção primária e acesso a cuidados de saúde (Qureshi et al. 1999). A incidência de hemorragia intracerebral na população japonesa (55 a cada 100 mil) é semelhante à dos negros (Suzuki et al. 1987) e isso pode ser devido à elevada prevalência de hipertensão e uso de álcool na população japonesa (Kagan et al. 1974). Além disso, os baixos níveis de colesterol de alta densidade (HDL – high density lipoprotein) sérico observados nesta população também podem ser a causa do maior fator de risco para a HI (Tanaka et al. 1982).

Já entre os fatores de risco modificáveis, a hipertensão é a mais prevalente, pois ela causa degeneração, fragmentação e necrose fibrinóide de pequenas artérias penetrantes no cérebro podendo assim resultar em ruptura espontânea. Por isso, esta é considerada o fator de risco mais importante. Ela está presente em 70 a 80% dos pacientes e já foi visto que o tratamento anti-hipertensivo é capaz de levar a uma redução de aproximadamente 41% do risco de AVE (incluindo a HI) (Law, Morris e Wald, 2009).

A segunda causa mais comum de HI se deve à angiopatia amilóide cerebral, sendo responsável por cerca de 15% dos casos (Qureshi et al. 2001). Nesta patologia ocorre a deposição da proteína β -amilóide em vasos sanguíneos do cérebro, resultando em fragilidade vascular.

Diversas coagulopatias também conferem risco de hemorragia intracerebral. O uso de anticoagulantes orais está relacionado com o aumento de 8 a 10 vezes do risco de HI em relação aos pacientes com a mesma idade que não foram submetidos à terapia anticoagulante (Hart et al. 1995). Além desses citados, outros fatores também estão relacionados como: tabagismo, consumo de álcool, maus hábitos alimentares e falta de atividade física (Jeyaraj et al. 2018).

1.2.2 Fisiopatologia da Hemorragia Intracerebral

A hemorragia intracerebral é classificada dependendo da etiologia do sangramento (Mayer e Rincon, 2005). Na HI primária a hemorragia se origina da ruptura espontânea de pequenas artérias ou arteríolas que estão danificadas (devido à hipertensão crônica, ou pela angiopatia amilóide, por exemplo). Esta é responsável por 80 a 85% dos casos. Já na HI

secundária a hemorragia é resultante de um trauma - como a ruptura de um aneurisma, uma má-formação vascular, coagulopatia entre outros, representando 15 a 25% dos casos (Pontes-neto et al. 2009).

No caso da HI primária também chamada de espontânea - que é o foco deste trabalho - a ruptura decorrente das artérias ou arteríolas conferem um extravasamento agudo de sangue na região do parênquima cerebral. Esse extravasamento pode ocorrer em diversas regiões cerebrais, porém, as áreas mais atingidas são os gânglios da base, o tálamo, o tronco encefálico e o cerebelo. Além disso, alguns fatores de risco podem contribuir para determinar o local da hemorragia (Qureshi et al. 2001). A região onde ocorreu o evento hemorrágico e a presença de quadros de hemorragias secundárias são fatores importantes para futuro tratamento e recuperação da mesma (Biffi et al. 2015).

A HI é um processo dinâmico e complexo. Muitas hemorragias continuam crescendo e se expandindo várias horas após o início dos sintomas – processo conhecido como crescimento precoce do hematoma (Gebel et al. 2002). Alguns fatores como distorção tecidual local e a ruptura da anatomia cerebral podem levar a um processo de sangramento multifocal em alguns pacientes, contribuindo para que ocorra um aumento do hematoma devido à adição de pequenas hemorragias vindas da periferia. Além disso, outras alterações podem contribuir para o crescimento precoce do hematoma, incluindo a quebra da barreira hematoencefálica ou coagulopatia local (Mayer, 2003). A maior parte desse inchaço formado e da lesão cerebral que ocorre após evento hemorrágico é resultado da ativação da cascata de coagulação e da inflamação induzida no local (Mayer e Rincon 2005), que será detalhada em tópicos subsequentes.

O crescimento precoce do hematoma é um fator importante, pois a massa do hematoma pode aumentar a pressão intracraniana comprimindo assim as regiões cerebrais, podendo afetar o fluxo sanguíneo e levar a uma herniação cerebral, sendo a principal causa de deterioração neurológica após o primeiro dia, caracterizando então uma intensa morte neuronal (Mayer et al. 1994). O número de pacientes com deterioração neurológica é maior no dia da hemorragia e diminui progressivamente a cada dia subsequente (Mayer et al. 1994). A presença desse hematoma inicia o edema e o dano neuronal no parênquima cerebral, pois, o fluido começa a se acumular imediatamente na região que envolve o hematoma, e assim o edema é formado podendo persistir por até cinco dias (Qureshi et al. 2001). Esse edema resulta da liberação e acúmulo de proteínas séricas ativas do coágulo, podendo também ser

resultante da ruptura da barreira encefálica, e/ou devido à morte de neurônios (Wagner et al. 1996,1998).

Assim que formado o hematoma, a cascata de coagulação é iniciada liberando trombina e fibrinas na região do evento hemorrágico (Knight et al. 2008). Estes produtos liberados pelo hematoma coagulado se infiltram no tecido cerebral adjacente e são os principais desencadeadores do processo inflamatório (Aronowski e Zhao, 2011). Portanto, os danos primários da HI são consequências diretas do hematoma formado causando deformação do tecido e compressão das áreas ao seu redor, e os danos secundários estão mais relacionados com a resposta inflamatória desencadeada por elementos do sangue extravasado no parênquima cerebral.

No momento do evento hemorrágico, os elementos presentes no sangue, como eritrócitos e proteínas do plasma, são extravasados para o parênquima cerebral liberando seus componentes e gerando estresse oxidativo no local (Keep et al. 2014). Além disso, muitas células entram em apoptose ou sofrem necrose proporcionando mais inflamação, podendo afetar as células vizinhas que ainda estão viáveis - como neurônios e astrócitos, e assim contribuir para o comprometimento neurológico do paciente (Sutherland et al. 2011). Esses eritrócitos extravasados podem sofrer lise durante o processo, liberando assim a hemoglobina contida em seu interior, que por sua vez pode liberar heme e ferro em sua forma livre, causando dano oxidativo e promovendo resposta inflamatória no local.

1.3 Neuroinflamação induzida na HI

A inflamação é uma resposta adaptativa desencadeada por estímulos e condições danosas como infecção e injúria tecidual que consiste de três etapas cruciais: o reconhecimento dos indutores da inflamação por sensores, a produção e liberação de mediadores inflamatórios frente à ativação dos sensores, e a atuação dos mediadores nos tecidos alvo (Medzhitov, 2008). Neste contexto, a resposta inflamatória desencadeada pela HI promove a produção e liberação de mediadores inflamatórios por células da imunidade inata. Esses mediadores atuam sinalizando para células e órgãos o desequilíbrio gerado, o que desencadeia resposta adaptativa com o objetivo de restabelecer a homeostase no organismo pela restauração do tecido danificado (Medzhitov, 2008).

Os eventos hemorrágicos espontâneos culminam na liberação de heme e ocorrem na ausência de infecção, como é o caso da HI, sendo assim, se caracterizam como uma resposta inflamatória estéril. Neste caso, moléculas endógenas são as responsáveis por iniciar esse tipo de inflamação, pois estas normalmente estão restritas ao ambiente intracelular, e quando expostas na circulação sinalizam ao organismo que houve morte celular, ou algum dano (Medzhitov, 2008). Essas moléculas endógenas capazes de induzir inflamação são conhecidas como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). , sendo elas as indutoras do processo inflamatório (Dutra e Bozza, 2014).

Neste contexto, esses fatores inflamatórios endógenos liberados no sistema nervoso central (SNC) - como é o caso do heme - são reconhecidos pelos sensores inflamatórios que atuam reconhecendo DAMPs liberados pelo tecido cerebral lesionado. Esses DAMPs interagem com receptores inatos, como receptores do tipo toll (TLR) iniciando a cascata inflamatória. Após o reconhecimento dos DAMPs, uma resposta celular é desencadeada que culmina na expressão de genes envolvidos na fase aguda da resposta inflamatória e assim os mediadores inflamatórios são liberados.

As primeiras células a responderem à injúria cerebral são as micróglia, que são células residentes do SNC. As micróglia são células fagocíticas oriundas do saco vitelínico embrionário e tem papel na manutenção da homeostase tecidual proporcionando o reconhecimento das condições do tecido e promovendo a sobrevivência neuronal e o estabelecimento das sinapses neurológicas (Mracsko e Veltkamp, 2014). No momento do evento hemorrágico, a liberação de DAMPs é reconhecida pelos receptores presentes na superfície da micróglia, e estas respondem imediatamente a injúria tecidual se ativando e projetando seus dendritos para os sítios danificados, podendo permanecer no estado ativo durante longos períodos. Essa ativação passa por múltiplas fases que incluem alteração morfológica, mudanças eletrofisiológicas, proliferação, capacidade migratória, liberação de mediadores inflamatórios e indução de fagocitose (Iadecola e Anrather, 2011).

Após HI, a micróglia desempenha um importante papel na fagocitose dos componentes sanguíneos liberados no parênquima cerebral, além da depuração de restos celulares contribuindo para a resolução da inflamação (Aronowski e Zhao, 2011). Por outro lado, ela também libera quimiocinas como CXCL2 que têm atividade quimiotática sobre leucócitos e, portanto, exacerba a reação inflamatória (Shiratori et al. 2010). Essa contradição pode ser explicada porque assim como os macrófagos, a micróglia também pode ter o perfil

M1 ativado classicamente ou o fenótipo M2 alternativamente ativado. A micróglia polarizada M1 produz citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , interleucina-1b (IL-1b) ou IL-6, além de enzimas pró-oxidantes. Já a micróglia polarizada M2 tem atividade de arginase, produzindo fatores neurotróficos e IL-10. O fenótipo de micróglia M2 tem sido associado com efeitos neuroprotetores e regenerativos após lesão cerebral. Devido a essa polaridade, micróglia/macrófago podem exercer efeitos controversos em doenças cerebrais e lesões (Kigerl et al. 2009; Liao et al, 2012).

Outro grupo celular imprescindível para as funções homeostáticas do SNC e controle do fluxo sanguíneo são os astrócitos. Essas células formam a barreira hematoencefálica - separando o SNC dos vasos sanguíneos, espaço periférico e meninges, também atuando como barreira para a passagem de células do sistema imune periférico para o interior do cérebro. Além disso, essas células também secretam fatores neuroprotetores, contribuindo com a homeostase cerebral (Belanger e Magistretti, 2009). Em situações de injúria tecidual, os astrócitos são ativados apresentando alterações morfológicas e funcionais - restringindo a inflamação, protegendo os neurônios, e promovendo reparo neuronal após lesão cerebral (Sofroniew, 2005; Swanson et al. 2004.) Porém, a inibição dessa ativação foi associada com uma melhora na função neurológica e na redução do edema cerebral (Munakata et al. 2013), sugerindo que a ativação dos astrócitos exerce efeitos deletérios após HI. Também foi descrito que a indução de metaloproteinasas pelos astrócitos participa do edema cerebral na HI (Tejima et al, 2007), contribuindo com o dado que os astrócitos causam efeitos deletérios. Portanto o significado funcional dos astrócitos ativados na HI permanece incerto necessitando de mais estudos para melhor entendimento.

Além das células locais do SNC a resposta inflamatória não fica confinada ao cérebro. Hoje em dia, já se sabe que o dano cerebral causa alteração imune complexa de forma sistêmica. A infiltração de células da periferia no cérebro ocasionada por processo inflamatório é uma marca registrada em eventos de HI, como observado na infiltração de leucócitos na região lesionada (Mracsko e Veltkamp, 2014). Os neutrófilos são células secretoras e fagocíticas do sistema imune inato e possuem diferentes tipos de grânulos citoplasmáticos e vesículas secretoras, fazendo parte da população de leucócitos que migra primeiro para o cérebro após a lesão. Os mediadores inflamatórios liberados no momento da lesão, além de realizar o recrutamento dos neutrófilos, também propiciam o aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície dessas células e ativação endotelial nos capilares sanguíneos. Assim a infiltração ocorre envolvendo o processo de rolamento, adesão

e migração transendotelial, chegando então no local da injúria (Iadecola e Anrather, 2011). Uma vez no local, essas células parecem contribuir para a produção de espécies reativas de oxigênio e proteases pró-inflamatórias que em conjunto podem culminar na quebra da barreira hematoencefálica (Wang, 2010).

A trombina presente no local hemorrágico também é capaz de induzir a ruptura da barreira hematoencefálica (Liu et al. 2010), em conjunto, a hemoglobina e seus produtos liberados aumentam a permeabilidade da mesma (Yang et al. 2013). Isso permite que mais neutrófilos possam infiltrar, em conjunto com as demais células, como linfócitos e macrófagos, e assim liberarem mais citocinas e quimiocinas contribuindo com a inflamação e com a lesão cerebral. Nesse contexto, o recrutamento de células da periferia para o cérebro está normalmente associado com a neurotoxicidade induzida no HI, embora a importância do recrutamento dos neutrófilos no estabelecimento da homeostase e na função cerebral a longo prazo ainda não esteja totalmente elucidado.

Com os danos causados na barreira hematoencefálica prejudicando seu funcionamento e permitindo a passagem de diferentes tipos celulares para o interior do cérebro, células apresentadoras de antígenos (APCs) também podem se infiltrar no local da injúria. Esse fato se confirma visto que o número de APCs é reduzido na periferia e aumentado na região do dano cerebral no momento do pico da infiltração celular (Yilmaz et al. 2009; Felger et al. 2010). As células dendríticas são APCs profissionais que constituem a principal interface entre a imunidade inata e a adaptativa. Em condições fisiológicas elas estão associadas a meninges, plexo coróide e líquido cefalorraquidiano (Iadecola e Anrather, 2011). Como citado anteriormente, no ambiente da HI há liberação de diversos DAMPs que só aumentam conforme as células vão morrendo pelos danos inflamatórios. Esses sinais de dano também liberados pelas células locais podem ser processados pelas APCs possibilitando a apresentação de antígenos provindos de tecidos que antes eram protegidos pela barreira hematoencefálica (Kono e Rock, 2008), realizando a ponte para a resposta adaptativa. A apresentação de antígenos leva ao desenvolvimento da imunidade celular e humoral, tendo potencial de induzir autoimunidade contra o tecido no qual ocorreu a morte celular (como é observado na esclerose múltipla, por exemplo) (Felger et al. 2010).

Linfócitos também foram encontrados no líquido cefalorraquidiano seis horas após HI (Lee et al. 1975), e no tecido cerebral peri-hematoma durante craniotomia em pacientes com HI (Guo et al. 2006). Dentre os linfócitos infiltrados, as células T CD4⁺ são

predominantemente presentes no cérebro um dia após evento hemorrágico, atingindo seu pico no dia cinco. Já as células B e as natural killer (NK) possuem uma baixa taxa de infiltração, sugerindo um papel menor na inflamação induzida na HI (Mracsko e Veltkamp, 2014).

A resposta adaptativa requer um intervalo de 7-10 dias do momento da apresentação do antígeno à expansão clonal das células T autorreativas e ataque ao tecido alvo (Abbas, 2010). Entretanto se a HI realmente promove resposta adaptativa com caráter autoimune, ainda é uma questão em debate. Corroborando com ideia de que ela promove a resposta adaptativa, já foi observado que antígenos do SNC e resposta humoral associada estão presentes após o AVE (Bornstein et al. 2001; Dambinova et al. 2003) e que células T respondem a eles após acidente vascular (Rocklin et al. 1971). Além disso, um modelo experimental de indução de tolerância a antígenos do SNC conferiu uma proteção após AVE, reduzindo os danos (Becker et al. 1997). Por outro lado, um trabalho demonstrou que a ausência de moléculas co-estimulatórias necessárias para a apresentação do antígeno, não afetam o resultado pós hemorrágico, e que o dano mediado pelas células T é independente de antígeno (Kleinschnitz et al. 2010). Portanto, mais estudos são necessários para compreender melhor essa questão.

No intuito de sanar os danos do evento hemorrágico as células do sistema imune como a micróglia e macrófagos infiltrantes promovem a resolução no local através da fagocitose de debris celulares e liberação de fatores anti-inflamatórios, visando um reparo na região (Aronowski e Zhao, 2011). Neurônios e astrócitos produzem fatores de crescimento que ajudam a estabelecer um ambiente favorável ao surgimento da neurogênese, angiogênese, gliogênese e reorganização da matriz, contribuindo com a homeostase (Greenberg e Jin, 2006). Mesmo após resolução da lesão, o local permanece com uma cavidade onde o tecido foi destruído, além de uma cicatriz composta por células gliais. Como dito anteriormente, a importância da infiltração das células no restabelecimento do cérebro ainda não está totalmente elucidada, existindo uma dicotomia entre efeitos deletérios e benéficos promovidos pelas células infiltrantes no tecido cerebral. Dependendo do evento hemorrágico, o paciente pode apresentar recuperação da função neurológica, embora essa recuperação na grande maioria dos casos seja incompleta, e o mesmo passa a apresentar algum déficit neurológico (Mracsko e Veltkamp 2014).

Há uma premissa de que os eventos inflamatórios estejam associados com neurodegeneração, apesar de os mecanismos desencadeados na neurodegeneração ainda não

estarem totalmente descritos (Ransohoff, 2016). Dessa maneira, é de suma importância o entendimento dos mecanismos inflamatórios desencadeados pela HI para a descoberta de novas terapias que tenham como alvo esse evento imprescindível para o desenvolvimento do quadro dos pacientes com AVE.

1.4 Heme

O heme (Ferro-protoporfirina IX) é um grupamento prostético de diversas enzimas e proteínas que consiste de um átomo de ferro contido no centro de um anel tetrapirrólico, presente nas proteínas desempenhando um importante papel em suas funções (**Figura 3**). A capacidade do ferro (Fe) inserido nessa estrutura de sofrer alterações reversíveis em seu estado de oxidação trocando entre os estados ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}), torna o heme uma molécula capaz de realizar processos como transporte de O_2 , transferência de elétrons, metabolismo de drogas e respostas oxidantes (Soares e Hamza, 2016).

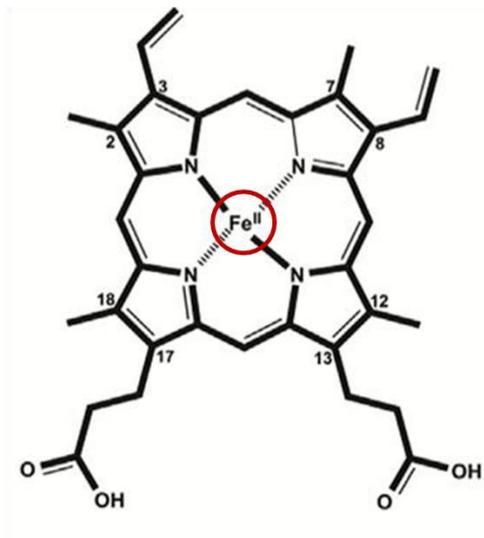


Figura 3. Estrutura do Heme (Ferro-Protoporfirina IX). O heme é formado por uma parte orgânica (protoporfirina IX) e um átomo de ferro (Fe) ligado no centro desse anel. Adaptado de http://qnint.sbq.org.br/sbq_uploads/layers/imagem1772.jpg

Nos mamíferos, o ferro é encontrado principalmente na forma de heme (Korolnek e Hamza, 2016), enquanto que a maior parte do heme se encontra inserida na hemoglobina. Na hemoglobina o heme realiza sua principal função propiciando o processo de transfêrencia de elétrons entre o ferro e oxigênio (O_2) permitindo assim o transporte de O_2 no organismo e sendo a hemoproteína em maior quantidade presente nas hemácias (Soares e Hamza, 2016). A

hemoglobina é a hemoproteína mais abundante e os eritrócitos são o tipo celular mais rico em heme. Cada eritrócito possui aproximadamente $2,5 \times 10^8$ moléculas de hemoglobina e cada uma possui quatro moléculas de heme em seu interior, portanto cada hemácia contém cerca de 10^9 moléculas de heme (Korolnek e Hamza, 2016).

O heme é sintetizado de forma conservada nos mamíferos sendo sua síntese realizada em todas as células nucleadas, com uma parte do processo ocorrendo no citoplasma e outra parte na mitocôndria (Hamza e Dailey, 2012). O átomo de ferro utilizado para formação de novos grupos heme é obtido em sua maior parte, do próprio heme – vindo da alimentação ou removido da hemoglobina dos eritrócitos senescentes. Este último representa a maior fonte de ferro do organismo, que é disponibilizado por uma linhagem específica de macrófagos denominados eritrofagocíticos ou macrófagos do sistema reticuloendotelial (Soares e Hamza, 2016). Depois de sintetizado, o heme é integrado a uma cadeia polipeptídica e passa a desenvolver seu papel de acordo com a hemoproteína na qual está associado.

1.4.1 Citotoxicidade do Heme

Em condições fisiológicas, o heme se encontra restrito ao ambiente intracelular, ligado às hemoproteínas e desenvolvendo normalmente sua função, porém em situações de hemorragia ocorre a liberação de hemácias no parênquima cerebral podendo acarretar na ruptura dos eritrócitos, levando a liberação de grandes quantidades de hemoglobina (Roumenina et al. 2016). Uma vez que a hemoglobina é liberada, ela pode sofrer rápida oxidação formando uma molécula denominada metemoglobina, que por sua vez é estruturalmente instável e que rapidamente libera o heme na sua forma livre (Ferreira et al. 2008; Balla et al. 1993).

As características próprias do heme que o capacitam para realizar suas funções essenciais nos processos biológicos como o transporte de O_2 , também fazem dele uma molécula citotóxica quando livre na circulação. Isso se deve ao seu baixo peso molecular e à sua propriedade lipofílica que permite que ele se intercale em ambientes apolares, como a bicamada lipídica celular, causando assim uma desorganização na membrana das células aumentando a sua permeabilidade (Schmitt, Frezzatti e Schreier, 1993). Isso ocorre porque o anel porfirínico hidrofóbico do heme tem elevada afinidade por lípidos membranares, com isso, os lípidos podem sofrer peroxidação devido ao contato com o ferro do heme. Essa

peroxidação promove a permeabilidade da membrana, podendo causar seu rompimento seguido de morte celular. (Chiu et al. 1996; Chiabrando et al. 2014). Assim, ao interferir na composição e estrutura da membrana plasmática das células, o heme pode induzir a lise das mesmas, promovendo morte celular e liberação de DAMPs.

Em adição aos efeitos da composição química do heme, este é considerado tóxico devido sua capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), danificando macromoléculas de forma irreversível. Já foram descritos diferentes mecanismos através dos quais o heme induz a geração de ROS e radicais livres, como pela atuação do ferro na Reação de Fenton, pela indução da enzima NADPH oxidase ou através do metabolismo oxidativo mitocondrial (Graça-Souza et al. 2002; Dutra et al. 2014; Alves, 2015). Em adição, através da geração de ROS, o heme é capaz de promover a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Pazos et al. 2008; Aft e Muellers, 1984; Gleit et al. 2006).

O heme, além de causar dano oxidativo através da geração de ROS, também é capaz de ativar as células do sistema imune, e assim, promover a inflamação (Dutra e Bozza, 2014). Isso é observado pelo aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos do ambiente intravascular em direção aos tecidos e aumento das proteínas de fase aguda, em animais injetados com heme (Wagener et al. 1999). Na circulação, o heme induz ativação das células endoteliais, fazendo com que elas aumentem a expressão de moléculas de adesão que permitem a firme ligação dos leucócitos na parede endotelial (Wagener et al. 1999, 2001). Além disso, ele também induz essas células a expressarem CXCL8 - um fator quimiotático para neutrófilos. Essa quimiotaxia de neutrófilos também depende de outros fatores como: geração de ROS, ativação da proteína quinase C (PKC) e a própria produção de CXCL8 pelos neutrófilos (Graça-Souza et al. 2002; Porto et al. 2007).

Já foi observado que o heme é capaz de induzir a morte celular de macrófagos com características de necrose programada. Isso ocorre, pois o heme induz os macrófagos a liberarem mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF), que é um fator essencial para ativação da via de morte celular necrótica programada, denominada necroptose (Fortes et al. 2012). Essa liberação induzida pelo heme ocorre através da ativação do receptor do tipo toll 4 (TLR4) (Figueiredo et al. 2007). Ainda em macrófagos, o heme é capaz de induzir a ativação do inflamossomo via NLRP3, que é um mecanismo importante para a mortalidade induzida em modelo de hemólise intravascular (Dutra et al. 2014). Assim, a

capacidade do heme em ativar diferentes vias pode contribuir para o estado de inflamação sistêmica e resultar em intensa injúria tecidual.

Como citado anteriormente, a HI é uma inflamação estéril sendo ativada por componentes endógenos que sinalizam o dano. Em conjunto, as respostas inflamatórias desencadeadas pelo heme já descritas, e seus efeitos citotóxicos quando livre, indicam que ele é um DAMP, visto que em condições fisiológicas ele está restrito ao ambiente intracelular das hemeproteínas, e quando livre é capaz de promover e exacerbar as respostas imunológicas. Sendo assim, elevadas concentrações de heme livre podem iniciar um intenso processo inflamatório envolvendo morte celular, ativação de programas pró-inflamatórios, produção de ROS e dano tecidual, que em conjunto sinalizam a quebra da homeostase do organismo.

1.4.2 Controle do Heme na forma livre

Como descrito anteriormente, o heme possui características que põe em risco a integridade do sistema. Sendo assim, o organismo precisa estar preparado para controlar seus efeitos deletérios quando liberado em altas concentrações, como na hemorragia intracerebral. Dentre os mecanismos presentes no organismo estão proteínas que circulam normalmente pelo nosso corpo como a haptoglobina – que é responsável por se ligar à hemoglobina, e a hemopexina que se liga ao heme (Ferreira et al. 2008) (**Figura 4**).

A haptoglobina possui alta afinidade pelos dímeros que formam a hemoglobina, assim, quando esta é liberada para o ambiente extracelular, a haptoglobina presente na circulação se liga a ela, e com essa ligação, ocorre a inibição da oxidação do ferro e assim o grupo heme é estabilizado e não é liberado (Mcculloch et al. 2015). O complexo haptoglobina:hemoglobina formado é reconhecido pelos macrófagos e endocitado (Graversen, Madsen e Moestrup, 2002), assim, a hemoglobina é carregada para o compartimento intracelular e não causa dano na região que foi liberada. Contudo, em situações de intensa hemorragia, a haptoglobina circulante não é suficiente para conter a liberação maciça de hemoglobina, e neste caso, a hemoglobina é rapidamente oxidada a metemoglobina, que por sua instabilidade, leva a liberação de heme livre na circulação, que pode causar seus efeitos deletérios.

A hemopexina por sua vez, se liga ao heme livre a com alta afinidade e assim é capaz de reduzir sua toxicidade inibindo suas propriedades oxidantes (Paoli et al. 1999). O

complexo hemopexina:heme é reconhecido pelo receptor CD91 expresso em diversos tipos celulares e por esse reconhecimento, o complexo é endocitado (Hvidberg et al. 2005). Após internalização, a acidificação promovida pelo vacúolo endocítico, possibilita a separação do complexo, e a hemopexina livre retorna ao meio extracelular para ser reciclada (Mauk et al. 2005). A albumina é outra proteína sérica que contribui para remoção do heme livre na circulação. Ela está presente em grandes quantidades no soro e se liga ao heme com menor afinidade (Ascenzi e Fasano, 2009), no entanto, os receptores envolvidos no reconhecimento e endocitose do complexo albumina: heme ainda não foram descobertos.

Uma vez internalizado, o heme é degradado pelo sistema enzimático da heme-oxigenase (HO). Já foram identificadas duas isoformas desse sistema: Heme-oxigenase 1 (HO-1) e heme-oxigenase 2 (HO-2), elas resultam da transcrição de genes diferentes e são expressas em diferentes células e tecidos, além de diferirem nas condições de regulação (Wagener et al. 2003). A HO-1 tem sua expressão aumentada quando induzida com heme, e atua catalizando a degradação do heme em quantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono (CO) e Fe^{2+} (Ferreira et al. 2008). Esse ferro livre gerado é altamente oxidante, por isso, a atividade da HO-1 é sempre complementada pela ação da ferritina, que realiza o armazenamento de grandes quantidades de ferro de maneira solúvel e inócua. Em conjunto, a HO-1 e a ferritina permitem a rápida transferência do ferro contido no heme para o interior da ferritina, deixando-o indisponível para catalisar reações deletérias (Dutra e Bozza, 2014). A isoforma HO-2, diferente da HO-1, é expressa de forma constitutiva em alguns tecidos como o cérebro e endotélio (Atamna, 2004), sendo também responsável por catalizar a degradação do heme. O aumento da expressão das heme-oxigenases e da ferritina permite que as células sobrevivam ao estresse oxidativo causado pelo heme, tendo um papel anti-inflamatório.

No contexto da HI, o papel das proteínas citadas capazes de conter tanto a hemoglobina quanto o heme que foram extravasados é essencial para a melhora do quadro da doença, visto que elas também estão associadas ao controle da inflamação. A haptoglobina possui a capacidade de modular o perfil de citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos cerebrais, e assim, ela consegue atribuir propriedades imunomoduladoras que irão inibir a neuroinflamação induzida pelo heme, prevenindo a morte neuronal e os danos cerebrais (Philippidis et al. 2004). Ela também foi identificada como um marcador da ruptura da barreira hematoencefálica (Chamoun et al. 2001), portanto, seus níveis aumentam em doenças neurológicas associadas com a integridade da barreira (Spagnuolo et al. 2014). Seu efeito neuroprotetor foi revelado pelos déficits neurológicos aumentados que foram

detectados em camundongos geneticamente deficientes, demonstrando uma maior sensibilidade a hemorragias intracerebrais (Zhao et al. 2009). Esses animais também se mostraram mais susceptíveis a neuroinflamação, visto que os níveis de citocinas pró-inflamatórias como $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ estavam aumentados no cérebro dos mesmos (Galicia et al. 2009). Diferenças na expressão da haptoglobina também foram observadas com o avanço da idade (Spagnuolo et al. 2014), um período de vida caracterizado por um aumento de micro-hemorragias e estresse oxidativo cerebral (Zhao et al. 2009). Nos idosos, a alta expressão dessa proteína é detectada principalmente na região do hipocampo e no LCR, que se correlacionam com o desempenho cerebral prejudicado e com a redução da atividade neurológica (Teunissen et al. 2003).

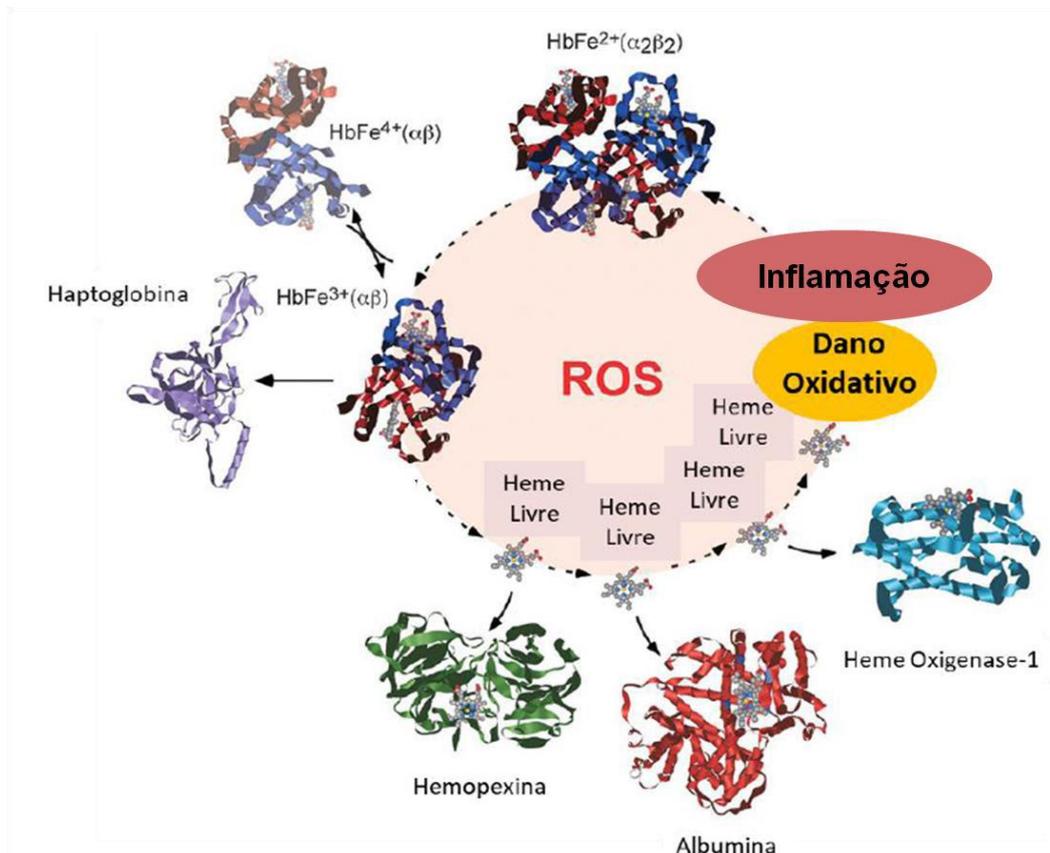


Figura 4. Mecanismos de defesa contra o heme livre. Quando extravasadas, as hemoglobinas ($HbFe^{2+}$) desagregam seus tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$ em dímero $HbFe^{2+}(\alpha\beta)$ que em contato com ROS geram $HbFe^{3+}(\alpha\beta)$ (metemoglobina). Esta por sua vez pode ser capturada pela haptoglobina. Quando ocorre a saturação de haptoglobina, há liberação de heme livre, que é então sequestrado pela hemopexina. O heme pode ser ainda sequestrado pela albumina, embora com afinidade menor. Além dos mecanismos citados existe o mecanismo de catabolismo intracelular do heme pela enzima heme oxigenase 1 (HO-1). Se todas estas etapas não forem suficientes para remover o heme livre no plasma, ocorre dano oxidativo irreversível, assim como toda cascata inflamatória. Adaptado de Ferreira et al. 2008.

A hemopexina também possui um efeito neuroprotetor, pois além de neutralizar a reatividade pró-oxidante do heme (Gutteridge e Smith, 1988), também é capaz de regular positivamente a expressão de HO-1 com subsequente liberação de CO. Essa atividade foi descrita como capaz de envolver mecanismos de reparo do DNA neuronal durante condições patológicas (Otterbein et al. 2011). Animais deficientes de hemopexina se mostraram susceptíveis a sofrerem desmielinização, mostrando sua importância na sobrevivência de oligodendrócitos (Todorich et al. 2009). Além disso, esses animais também apresentaram um número reduzido de células produtoras de mielina no córtex cerebral e gânglios da base (Morello et al. 2011), reforçando sua importância. Seu papel neuroprotetor também foi visto em modelo de isquemia cerebral, na qual sua administração intracerebroventricular foi associada a uma melhora significativa dos sintomas neurológicos (Dong et al. 2013).

Em conjunto, esses mecanismos protegem os tecidos do hospedeiro contra danos que essas moléculas livres podem causar, e assim promovem a homeostase. Como citado, a deficiência desses sistemas pode acarretar em graves consequências para o organismo. No entanto, mesmo que todas funcionem normalmente, em situações de hemorragia, essas proteínas podem saturar e não serem capazes de conter as altas concentrações de heme extracelular. Dessa maneira, o heme e seus efeitos oxidantes vão agir sobre o organismo e promover uma resposta inflamatória e toda injúria citada anteriormente.

1.4.3 Heme e Neurodegeneração

Dentre os efeitos deletérios do heme desencadeados pelo átomo de ferro contido em seu anel de protoporfirina, ele também é capaz de produzir ROS, promovendo intenso estresse oxidativo. Os neurônios são extremamente sensíveis a este fenômeno, dada à elevada taxa de consumo de oxigênio necessária para exercer as atividades metabólicas neuronais. Além disso, a baixa produção de energia, o comprometimento mitocondrial e a degeneração axonal são as principais consequências da vulnerabilidade neuronal ao estresse oxidativo, fatores envolvidos na etiologia de vários distúrbios neurodegenerativos (Fischer e Glass, 2007).

Além de prejudicar o funcionamento dos neurônios, a produção de ROS também prejudica a redistribuição dos canais iônicos, o que resulta na interrupção dos sistemas de aminoácidos excitatórios e na estimulação aumentada dos neurotransmissores, efeito

conhecido como excitotoxicidade neuronal (Coyle e Puttfarcken, 1993). Esse fator é comumente observado em distúrbios neuropsiquiátricos relacionados ao delírio e/ou demência (Dong, Wang e Qin, 2009) e a melhora dos sintomas é observada após administração de antioxidantes, o que indica ainda mais um possível envolvimento dos danos oxidativos causados pelo heme em patologias (Gilgun-sherki et al. 2002).

O estresse oxidativo mediado pelo heme também afeta a neuroplasticidade do cérebro, prejudicando o transporte axonal de organelas, lipídeos e proteínas (Smythies, 1999), o que resulta em inchaço axonal, formação de bolhas e degeneração. O estresse oxidativo exacerbado compromete os mecanismos moleculares que regulam a endocitose dos neurônios, o que prejudica a reciclagem dos neurotransmissores e seus respectivos receptores (Roediger e Armati, 2003). Além disso, as espécies reativas de oxigênio produzidas pelo heme são capazes de inibir as enzimas responsáveis pela síntese de neurotransmissores (Elseweidy et al. 2008), afetando assim o funcionamento neuronal e reduzindo a transmissão do sinal, levando a morte celular programada dos neurônios.

O heme também é capaz de induzir morte celular com características de necrose programada nos astrócitos, envolvendo perda da integridade da membrana plasmática e inibição pela necrostatina-1 e antioxidantes (Laird al. 2008). Já nas células endoteliais, o heme causa uma morte celular com características morfológicas de apoptose (Ponka, 1999), sendo também capaz de sensibilizar vários tipos celulares de origem não hematopoiéticas a sofrerem morte celular desencadeada por TNF, também com características de apoptose, ativação de caspases, encolhimento do núcleo, seguido da formação de corpos apoptóticos e condensação da cromatina (Atamna, 2004).

Em conjunto, todas as propriedades do heme, quando livre no ambiente extracelular o tornam um importante agente oxidativo e inflamatório, sendo reconhecido pelo sistema imune e ativando assim uma intensa resposta neuroinflamatória, que pode resultar em dano tecidual e morte celular. Dependendo da extensão e da gravidade da resposta inflamatória o organismo pode apresentar graves danos neuronais, culminando em neurodegeneração (Lin et al. 2012)

2. Justificativa

A inflamação tem se mostrado cada vez mais um fator importante no quadro de HI. Em conjunto, os componentes sanguíneos que são liberados no momento da hemorragia como hemoglobina, heme e ferro têm apresentado um papel marcante na progressão da inflamação gerada na doença. Entretanto, até os dias de hoje, poucos trabalhos demonstram claramente a capacidade do heme, quando em concentrações fisiológicas, por si só induzir efeitos similares aos encontrados na HI. Portanto, o intuito desse trabalho é avaliar o papel do heme como um indutor mínimo dentre os componente sanguíneos para a inflamação induzida no modelo de HI. Assim, objetivamos descrever parte dos mecanismos inflamatórios que podem estar envolvidos na neurodegeneração, e com isso dar mais um passo para as bases de novas abordagens terapêuticas para essa doença, já que até o momento não existe uma proposta com eficácia garantida.

3. Objetivo

Este trabalho possui como objetivo descrever um novo modelo de Hemorragia Intracerebral através da injeção de heme, e assim estudar seu papel como um indutor mínimo para neuroinflamação e neurodegeneração que é observada nessa patologia.

3.1 Objetivos específicos

- Estabelecer o modelo de injeção de Heme no cérebro;
- Analisar a liberação de citocinas promovida pelo Heme;
- Avaliar o papel do Heme na lesão cerebral;
- Avaliar a importância do Heme como componente mínimo indutor de déficit funcional/comportamental.

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram fêmeas C57BL/6 com aproximadamente um mês e meio de vida pesando entre 18- 22g. Eles foram gerados e mantidos em temperatura constante (25⁰C) e com ciclos de 12 horas de luz/escuridão no biotério do Laboratório de Imunidade e Inflamação do departamento de Imunologia do IMPG. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do CCS.

4.2 Preparo do Heme

O heme foi pesado em tubos cônicos de 1,5mL, dissolvidos em 1:10 de volume final de NaOH (0,1 M-Sigma), diluídos 9:10 em PBS estéril e filtrado em filtro de seringa (0,22 μ m) logo após o preparo. As soluções estoque foram preparadas no escuro para evitar a geração de radicais livres e foram utilizadas para estímulo minutos após o preparo.

Foram utilizadas cinco doses diferentes de heme, onde a dose 1 (10^{17} moléculas) é a quantidade aproximada de heme encontrada em modelos de injeção de sangue autólogo. Tendo essa como dose base, as demais são 10x mais diluída (dose 0,1 - 10^{16} moléculas), 10x mais concentrada (dose 10 - 10^{18} moléculas), 100x mais concentrada (dose 100 - 10^{19} moléculas) e 1000x mais concentrada (dose 1000 - 10^{20} moléculas).

4.3 Cirurgia

Neste trabalho foi utilizado um modelo de hemorragia intracerebral que consiste na injeção de heme na região do *striatum* do cérebro do animal, região responsável pelas funções motoras (**Figura 5**). O procedimento utilizado - denominado Estereotaxia, se baseia em um mapa cartesiano em que a divisão do cérebro é feita por coordenadas. Através destas coordenadas é possível chegar à região de interesse, partindo do ponto (0,0) nos eixos ântero-posterior e médio-lateral do crânio, respectivamente, chamado de bregma. Achado o bregma

deve-se ajustar a coordenada no eixo médio-lateral (+0,2mm) chegando assim à região do *striatum*.

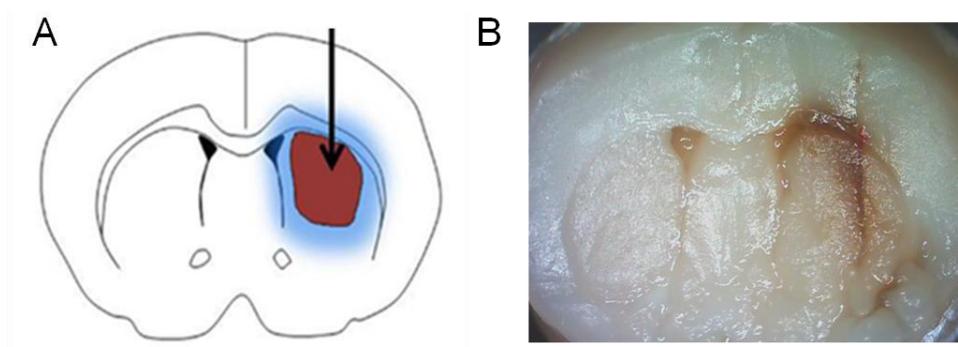


Figura 5. Imagem frontal do cérebro de camundongos com a região do *Striatum* destacada. (A) Imagem representativa de um cérebro indicando a região do *striatum* pela seta, tendo a região representada pela cor vermelha. Adaptado de Leonardo et al. 2012. **(B)** Imagem de um cérebro 24 horas após injeção de heme indicando que a injeção foi exatamente na região do *striatum*, imagem obtida pela lupa Zeiss Stemi Dv4.

O procedimento se inicia com a anestesia dos animais. Foi utilizado 0,7µl de Cetamina/g em conjunto com 0,5 µl de Xilazina/g de animal mixados a uma solução final de 200µl de PBS estéril. A injeção foi realizada via intraperitoneal. Após a verificação da efetividade da anestesia, através do reflexo de retirada da pata, o pêlo do animal foi cortado na região da cabeça e o mesmo foi posicionado no estereotáxico. Os olhos do animal foram protegidos por um lubrificante em gel (Visigel) para evitar o ressecamento. Em seguida foi realizado um corte com bisturi no centro da cabeça do animal, possibilitando assim, a localização do bregma. Seguindo as coordenadas já estabelecidas, é possível encontrar a região de interesse – o *striatum* . Assim, a craniotomia foi realizada neste local, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1mm, expondo as meninges e o parênquima cerebral. A injeção então é realizada, seguindo a coordenada de profundidade (-0,35mm). Foi injetado 5µl de heme dependendo da dose desejada (0,1 , 1, 10, 100 ou 1000) no ritmo de 1µl a cada 1 minuto, utilizando uma seringa de 5µl (Hamilton Company) de injeção automática, com auxílio de um injetor automático (**Figura 6**). Após a injeção, a agulha foi mantida no local por 10 minutos e retirada lentamente para evitar o refluxo do material injetado. O local aberto foi cuidadosamente fechado com auxílio de super-cola.

Para os animais controle foram utilizadas as mesmas condições, porém foi injetado 5µl de PBS estéril. Portanto nesse estudo utilizamos seis grupos experimentais: animais controle injetados com PBS, animais injetados com dose 0,1 de heme, animais injetados com dose 1 de heme, animais injetados com dose 10 de heme, dose 100 e dose 1000.



Figura 6. Procedimento cirúrgico para indução da hemorragia intracerebral. Animal anestesiado e posicionado na mesa estereotáxica com sua cabeça firmemente presa enquanto a injeção ocorre com a seringa automática. Imagem tirada pelo autor.

4.4 Análise Comportamental

Os animais foram submetidos a testes sensório-motores em dias intercalados, seguindo um cronograma (**Figura 7**) a fim de avaliar se houve algum dano funcional, perda de equilíbrio ou dor ao realizar os testes. Eles foram aclimatados durante 30 minutos em ambiente com temperatura de 24° apenas com a iluminação de uma luminária, após esse período os testes foram realizados nas mesmas condições.

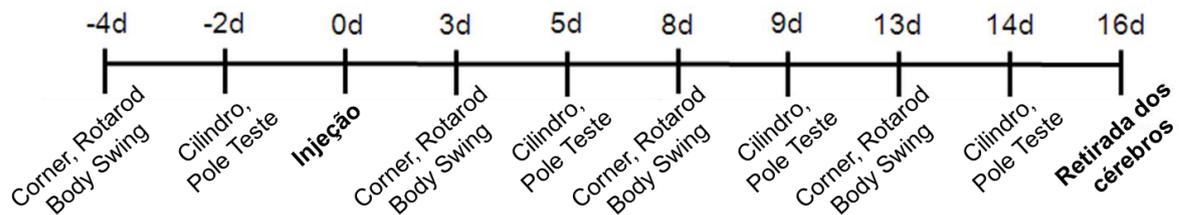


Figura 7. Cronograma dos testes sensório-motores. Os animais seguiram o cronograma realizando os testes em dias intercalados a fim de avaliar dano funcional, perda de equilíbrio ou dor durante a realização dos mesmos.

4.4.1 Rotarod

O Rotarod, ou teste da barra rotatória é um dos testes mais utilizados para avaliar a função motora e o equilíbrio em ratos e camundongos (**Figura 8**). A versão para camundongos foi inicialmente desenvolvida por Jones e Roberts em 1968 e consiste em colocar o animal sobre uma esteira em forma de cilindro que gira a uma velocidade constante ou aumentando sua velocidade gradualmente, dependendo do tipo de teste escolhido.

É avaliado então o tempo em que o animal consegue se equilibrar e correr sobre ela, analisando a coordenação motora e se o mesmo sente dor ao correr. Para permanecer na esteira, o animal deve caminhar de modo contínuo para frente coordenando bem os membros anteriores e posteriores. A incapacidade de realizar esse movimento faz com que o mesmo caia, ou gire pelo cilindro, e assim o tempo pára de ser cronometrado. O desempenho dos animais no Rotarod melhora com o treinamento até atingir um valor estável (Balkaya et al. 2013). Neste modelo de estudo, foi realizado o teste antes da HI para ser possível diferenciar entre a recuperação da função motora e a aprendizagem da corrida. Os animais realizaram três corridas por dia, com intervalos de 5 minutos entre elas, e a mediana do tempo foi utilizada para análise. Este teste foi realizado quatro dias antes da cirurgia, e nos dias 3, 8 e 13 após a cirurgia.



Figura 8. Rotarod. Aparelho utilizado para avaliar a função motora e o equilíbrio dos camundongos. Os animais são colocados no cilindro rotatório para correr em aceleração. A seta vermelha indica a velocidade que vai aumentando gradualmente, e a seta preta indica o painel onde o tempo de corrida é cronometrado. Imagem tirada pelo autor.

4.4.2 Body Swing

Esse teste consiste em observar a simetria dos animais através do comportamento de elevação do corpo para direita ou esquerda quando suspensos pela cauda (**Figura 9**). Em animais normais espera-se que subam aproximadamente o mesmo número de vezes para ambos os lados, portanto esse teste não precisa de treinamento.

O teste foi realizado 4 vezes com intervalos de 2 minutos, tendo 5 elevações consecutivas em cada, e então o animal era devolvido a caixa. Esse procedimento totalizou 20 elevações que foram analisadas através da fórmula $I/(I+C)$ onde I se refere à utilização da pata ipsilateral à lesão (esquerda) e C à utilização da pata contralateral à lesão (direita). O teste foi realizado quatro dias antes da cirurgia e nos dias 3,8 e 13 após a cirurgia.

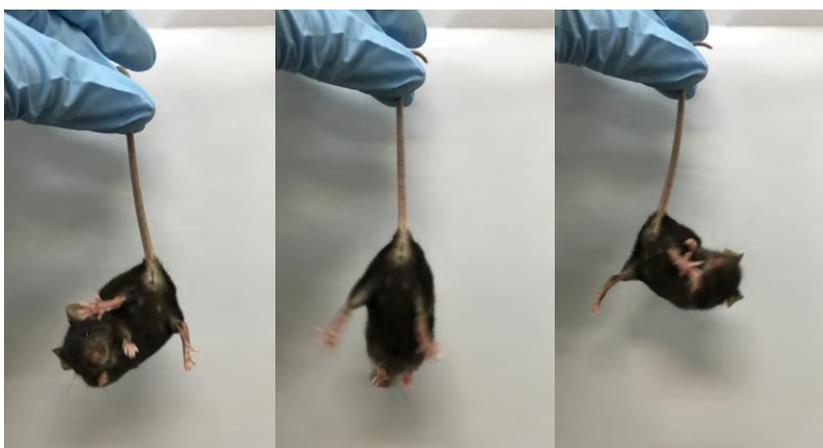


Figura 9. Movimento de elevação corporal dos camundongos. Ao serem suspensos pela cauda os animais elevam o corpo para o lado esquerdo ou direito. Imagem tirada pelo autor.

4.4.3 Cilindro

O teste do Cilindro é usado para avaliar a simetria do animal ao se apoiar com as patas dianteiras ao explorar o ambiente (**Figura 10**). Consiste em colocar o animal em um cilindro transparente de 10cm de diâmetro e 15cm de altura e analisar o uso dos membros anteriores durante a exploração vertical do ambiente, registrando o contato das patas com o vidro por 20 tentativas pelo período máximo de 10 minutos, avaliando se há preferência pela utilização da pata direita, esquerda ou ambas para realizar o apoio (Balkaya et al. 2013).

A fórmula utilizada para a análise foi: Taxa de Assimetria = $[I/(I+C+B)] - [C/(I+C+B)]$, onde I se refere à utilização da pata ipsilateral à lesão (esquerda), C à utilização da pata contralateral à lesão (direita) e B à utilização de ambas numa única subida (Hua et al. 2002). O teste foi realizado três dias de antes da cirurgia, e no dia 5, 9 e 14 após a cirurgia.

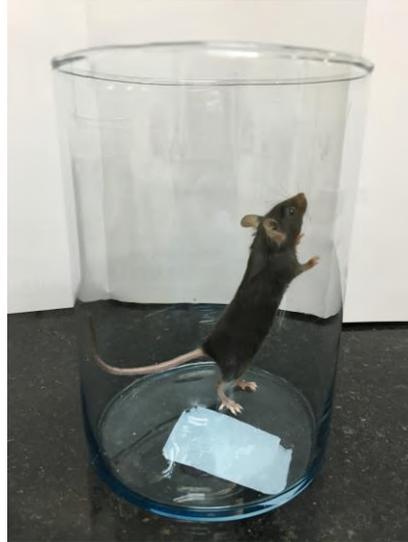


Figura 10. Teste do Cilindro. Teste usado para avaliar a simetria dos camundongos através da escolha da pata dianteira para apoio ao explorar o ambiente. Imagem tirada pelo autor.

4.4.4 Corner

O Corner, ou teste do canto é um teste capaz de detectar a assimetria sensório-motora no início e no final do tempo após um acidente vascular cerebral, especialmente em modelos que acometem o *striatum* (Balkaya et al. 2013). O aparato desse teste consiste em uma plataforma com dois cartões com dimensão de 30 x 20 x 1 ligados um ao outro formando um ângulo de 30° (**Figura 11**). No encontro das placas deve-se deixar uma pequena abertura para estimular os camundongos a irem até o canto. Os animais são introduzidos na plataforma, e quando vão para a região do canto, as vibrissas tocam ambos os cartões e assim são estimulados, levantando seus membros anteriores e explorando o ambiente da pequena abertura. Em seguida escolhem um lado (direita ou esquerda) para virar (Balkaya et al. 2013).

Os animais normais quando submetidos ao teste não demonstram preferência lateral, portanto para o Corner não há necessidade de treinamento. Para análise foi contabilizado 10 movimentos de virada, seguindo a fórmula $I/(I+C)$ onde I se refere à utilização da pata

ipsilateral à lesão (esquerda) e C à utilização da pata contralateral à lesão (direita). Foi realizado um pré-teste quatro dias antes da cirurgia para comparar com os dados pós cirurgia realizados nos dias 3, 8 e 13.



Figura 11. Corner. Ao serem introduzidos na plataforma os animais vão para a região do canto e exploram o ambiente se levantando e assim escolhendo o lado direito ou esquerdo para se virar. Imagem tirada pelo autor.

4.4.5 Pole Teste

O Pole é um teste simples que requer um equipamento básico, no qual os animais ficam em uma situação que os obriga a descer um poste vertical sendo possível analisar a coordenação motora dos mesmos. Para isso, é utilizado um poste de 50cm com diâmetro de 10mm com superfície áspera para permitir a tração do animal, este poste é mantido no centro de uma caixa com maravalha (**Figura 12**). Neste teste o camundongo é colocado no poste voltado para cima, e assim que ele se voltar para baixo e começar a descer, o tempo é cronometrado até ele alcançar a maravalha. Para esse teste os animais passam por um treinamento para aprender a realizar a descida, no qual são colocados voltados para baixo, deixando-os descer normalmente. Esse treinamento é realizado 5 vezes, com intervalos de 2 minutos em cada descida, e com um período de 15 segundos para o animal explorar a caixa logo que desceu. Após o treinamento os animais já podem realizar o teste normalmente. Animais que param no meio da descida, o que caem, devem ser posicionados para descer novamente (Balkaya et al. 2013).

Este teste foi realizado dois dias antes da injeção com três descidas com intervalos de cinco minutos entre elas, e o tempo mediano foi analisado assim como nos dias 5, 9 e 14 após cirurgia.



Figura 12. Pole Teste. Teste utilizado para avaliar a coordenação motora do animal ao descer pela barra. Imagem tirada pelo autor.

4.5 Retirada dos cérebros

No modelo de análise comportamental os animais foram sacrificados para retirada do cérebro após 16 dias. Estes foram então submetidos à perfusão transcardíaca com salina por cinco minutos com objetivo de retirar todo sangue do sistema vascular, seguido da infusão de paraformaldeído (4%) por cinco minutos para fixação do tecido. Ao final da perfusão, os cérebros foram dissecados e armazenados em 5ml de sacarose até o momento da realização dos cortes histológicos.

No modelo utilizado para análise inflamatória, os animais foram sacrificados para retirada do cérebro após 24 horas. Estes também foram submetidos à perfusão transcardíaca com salina por cinco minutos. Ao final, os cérebros foram dissecados e armazenados no freezer -80.

4.6 Análise Histológica

4.6.1 Aquisição dos cortes

A realização dos cortes histológicos ocorreu no micrótomo SM 2010R (Leica) que possui uma plataforma metalizada que é mantida congelada pelo contato com o gelo seco. Os cérebros foram fixados à plataforma na posição vertical com auxílio de uma camada de solução PBS, após fixação, os mesmos foram congelados com gelo seco para realização dos cortes. Os cérebros foram seccionados transversalmente à espessura de 20 μ m. Os cortes foram coletados com um pincel e transferidos a uma placa de 24 poços contendo uma solução criopreservante composta por 20% glicerol (Vetec), 30% etilenoglicol (Vetec), em tampão fostato 0,1M, ou seja, uma solução que estabiliza e protege o tecido da ação congelante do freezer. Ao término, as placas foram armazenadas no freezer até o momento da montagem das lâminas.

4.6.2 Preparo das lâminas

As lâminas foram previamente tratadas com gelatina (1,5g de gelatina, 0,15g de alumínio de cromo e 300ml H₂O destilada) para que permitisse uma melhor aderência do tecido em sua superfície.

Os cortes foram abertos em PBS 1x e com auxílio de um pincel, foram aderidos à lâmina e deixados à temperatura ambiente para secar por 24 horas. Após secagem as lâminas foram fixadas no vapor de paraformaldeído a 4% e mantidas na estufa.

4.6.3 Coloração de Cresil

Essa coloração se inicia com a lavagem das lâminas em água destilada durante 5 minutos, em seguida elas são embebidas no corante cresil por 5 minutos, e voltam para a água destilada por 5 minutos. Depois são embebidas em álcool 70% por 5 minutos, depois 95% e 100%, 3 minutos em cada respectivamente. Para a fixação da coloração elas ficam 10 minutos

no histochoice. Por fim a montagem foi realizada com Limoneno (Sigma), adicionando a lamínula com cuidado para não fazer bolhas.

4.7 Microscopia

As fotomicrografias foram obtidas no microscópio Axioplan com a objetiva com aumento de 2,5x e 10x. O *software* utilizado para a obtenção das fotos foi o Zen.

4.8 ELISA

A quantificação das citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-10, RANTES) nos sobrenadantes dos cérebros macerados 24 horas após cirurgia foi feita pela técnica de ELISA, de acordo com metodologia preconizada pelo fabricante (PeproTech). Resumidamente, placas de 96 poços com fundo chato foram sensibilizadas com anticorpos de captura diluídos em PBS e mantidas em temperatura ambiente (T.A.), overnight. Após etapa de lavagem com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) (Sigma), a placa foi bloqueada com PBS contendo 1% de BSA por 1h a T.A., seguida de nova etapa de lavagem com PBS-T. As amostras e o padrão de proteína recombinante foram diluídos em reagente diluente (PBS 0,05% tween, 0,1% BSA) e incubados a 4°C overnight. Após lavagem com PBS-T, foi adicionado os anticorpos de detecção em reagente diluente e a placa foi incubada por 2 horas em T.A. Após o período de 2h a placa foi lavada com PBS-T. Foi adicionada streptavidina (1:4000) diluída em reagente diluente por 30 minutos. Após etapa de lavagem, foi adicionado o substrato Tetrametilbenzidina (TMB) para revelar a reação, sendo a placa mantida no escuro. A reação foi interrompida usando HCL 1M. A densidade óptica foi obtida através de leitura, com filtro de 450 nm (Spectrax i3, molecular devices, Estados Unidos).

4.9 Análise estatística

Para a análise individual das doses foi realizado o teste ANOVA Bonferroni, e para análise comparativa entre os grupos o teste realizado foi o two way ANOVA, Fisher test. Os gráficos foram realizados no Graphpad Prism 6.

5. Resultados

5.1 Efeitos inflamatórios 24 horas após a injeção de Heme.

Como mencionado anteriormente, o heme foi descrito como um importante indutor de estresse e toxicidade celular, além de ser considerado um DAMP, sendo capaz de ativar resposta inflamatória. Porém, no momento do evento hemorrágico todos componentes sanguíneos são extravasados, podendo liberar outros DAMPs além do heme, e outros componentes tóxicos potenciais causadores de inflamação. Com o objetivo de averiguar se a injeção de heme se assemelha ao modelo de hemorragia intracerebral, foi realizada uma dosagem de citocinas (IL-1 β , IL-10, RANTES e TNF α) presentes nos cérebros dos animais.

Como controle, utilizamos a protoporfirina (PPIX) – uma porfirina que não possui o íon ferro em sua composição - justamente para avaliar se o ferro é importante para os efeitos inflamatórios do heme (**Figura 13**). Como esperado, os animais injetados com a protoporfirina tiveram seus níveis de citocinas pró-inflamatórias próximos aos observados nos animais sham, que foram submetidos ao mesmo processo, porém com a injeção do veículo (**Figura 14**). Nós observamos que em 24 horas após indução da HI, os animais passaram a produzir mais citocinas como IL-1 β , IL-10, RANTES quando comparados ao nível de citocinas produzida pelos animais sham tanto na dose 1000 (**Figura 14A, B e C**) quanto na dose 100 (**Figura 14B e C**). A citocina TNF α (**Figura D**) foi a única que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as doses injetadas e o controle.

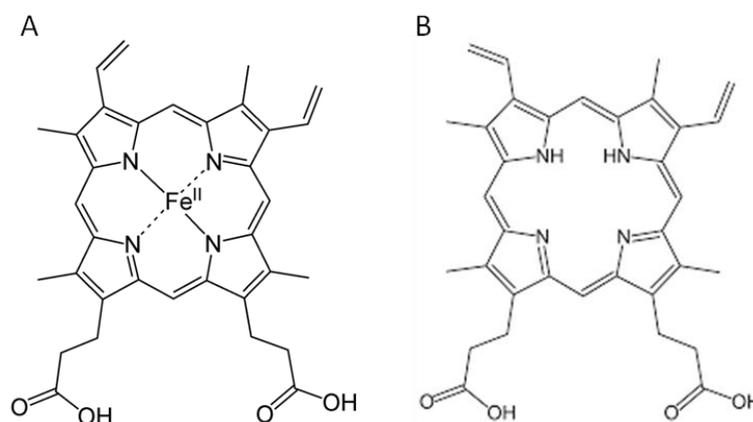


Figura 13. Estrutura molecular do heme e da protoporfirina. (A) O heme é formado por uma parte orgânica (protoporfirina IX) e um átomo de ferro (Fe) ligado no centro desse anel. (B) A protoporfirina possui a mesma estrutura do heme, porém sem o átomo de ferro em seu anel. <https://pt.wikipedia.org/>

Portanto, animais injetados com heme em ambas as doses (100 e 1000) induziram a produção de mais citocinas em relação aos animais sham, indicando que o modelo de HI apenas com a injeção de heme é capaz de causar inflamação. Além disso, os animais injetados com protoporfirina não apresentaram aumento na liberação das citocinas testadas indicando a importância do ferro para os efeitos inflamatórios do heme no cérebro.

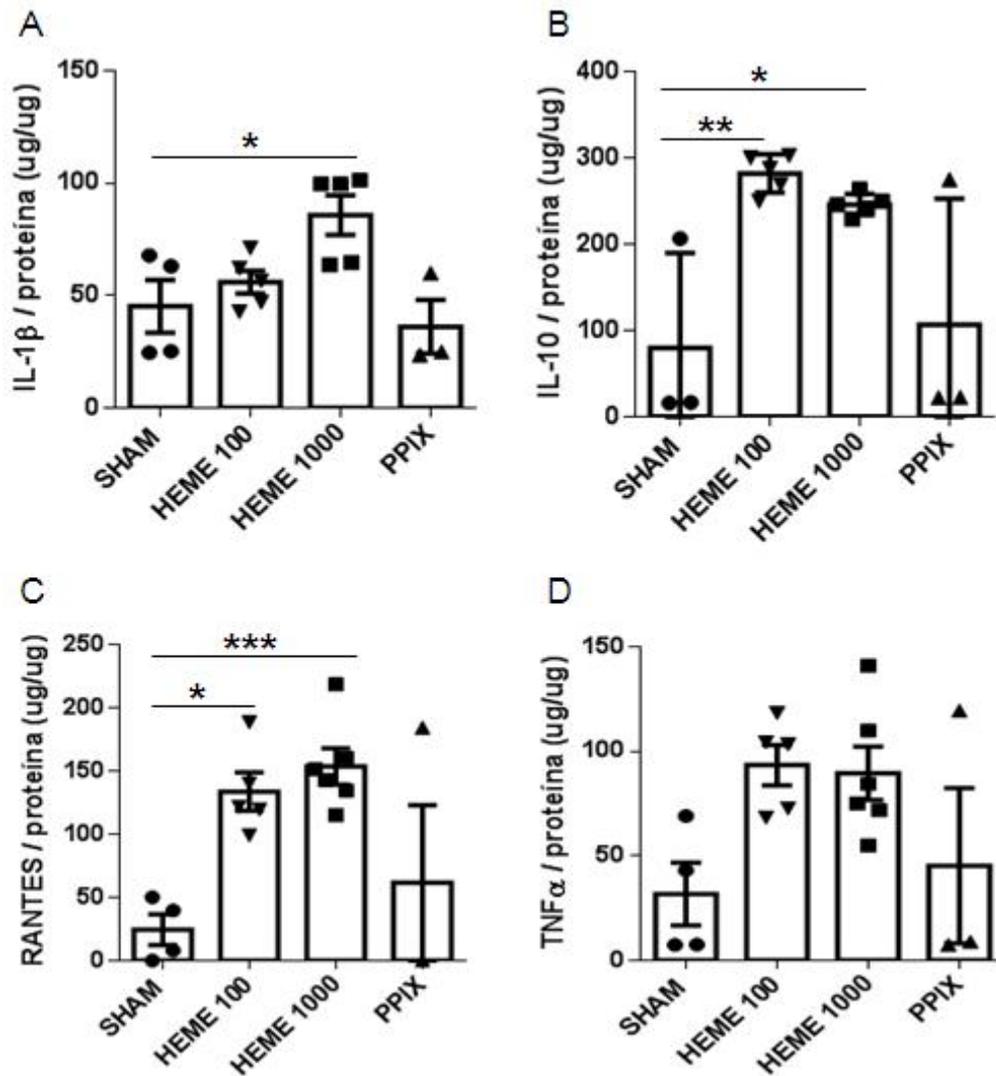


Figura 14. Liberação de citocinas 24h após a injeção de heme. Níveis de ELISA de (A) IL-1 β , (B) IL-10, (C) RANTES e (D) TNF α foram analisados a partir do sobrenadante do hemisfério cerebral esquerdo macerado de camundongos 24 horas após a injeção de heme, protoporfirina e veículo (Sham). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2 Análise histológica 24 horas após a injeção de Heme.

Após observarmos que 24 horas depois da injeção de heme ocorre resposta inflamatória no hemisfério injetado dos animais, nós analisamos se após esse mesmo período o heme também causa lesão tecidual. Para isso, utilizamos a coloração de Cresil que cora o retículo endoplasmático rugoso das células, local de síntese protéica. Portanto, regiões sem coloração não possuem células. Desta maneira, analisamos o cérebro de animais injetados com veículo (sham) e os animais com as maiores doses injetadas: dose 10, dose 100 e dose 1000 (**Figura 15**).

Nos animais sham as regiões ventriculares não apresentaram diferenças morfológicas, e a celularidade está parecida em ambos os hemisférios (**Figura 15A e B**). Já os animais injetados com a dose 10 tiveram alterações no ventrículo do hemisfério injetado, estreitando seu formato (**Figura 15C e D**), além disso, a injeção de heme também alterou a celularidade da região próxima ao *striatum*, onde as células estão distantes entre si, com espaços brancos, diferente do que é observado no hemisfério não injetado (**Figura 15D**). Os animais do grupo dose 10 também apresentaram cicatriz no local da injeção (**Figura 15E e G**), tendo células bem espaçadas ao redor da cicatriz (**Figura 15F e H**). A injeção da dose 100 de heme também alterou a morfologia dos ventrículos cerebrais dos animais, estreitando e alongando o tamanho do ventrículo do hemisfério injetado (**Figura 15I e J**). Os animais submetidos à injeção da maior dose de heme (dose 1000) também demonstraram alteração na conformação ventricular no hemisfério injetado (**Figura 15K e L**), e assim como o observado nos animais da dose 10, esses também apresentaram cicatriz na região do *striatum* – local onde ocorreu a injeção (**Figura 15M e O**). Essa cicatriz que indica a lesão, assim como observado anteriormente, também possui células espaçadas ao seu redor (**Figura 15N**).

A injeção de heme então é capaz de causar lesão com presença de cicatriz nas doses 10 e 1000 nas 24 após o evento hemorrágico. Além disso, ela altera a conformação ventricular nos animais injetados quando comparados ao sham, e também diminui a celularidade na região acometida pela HI.

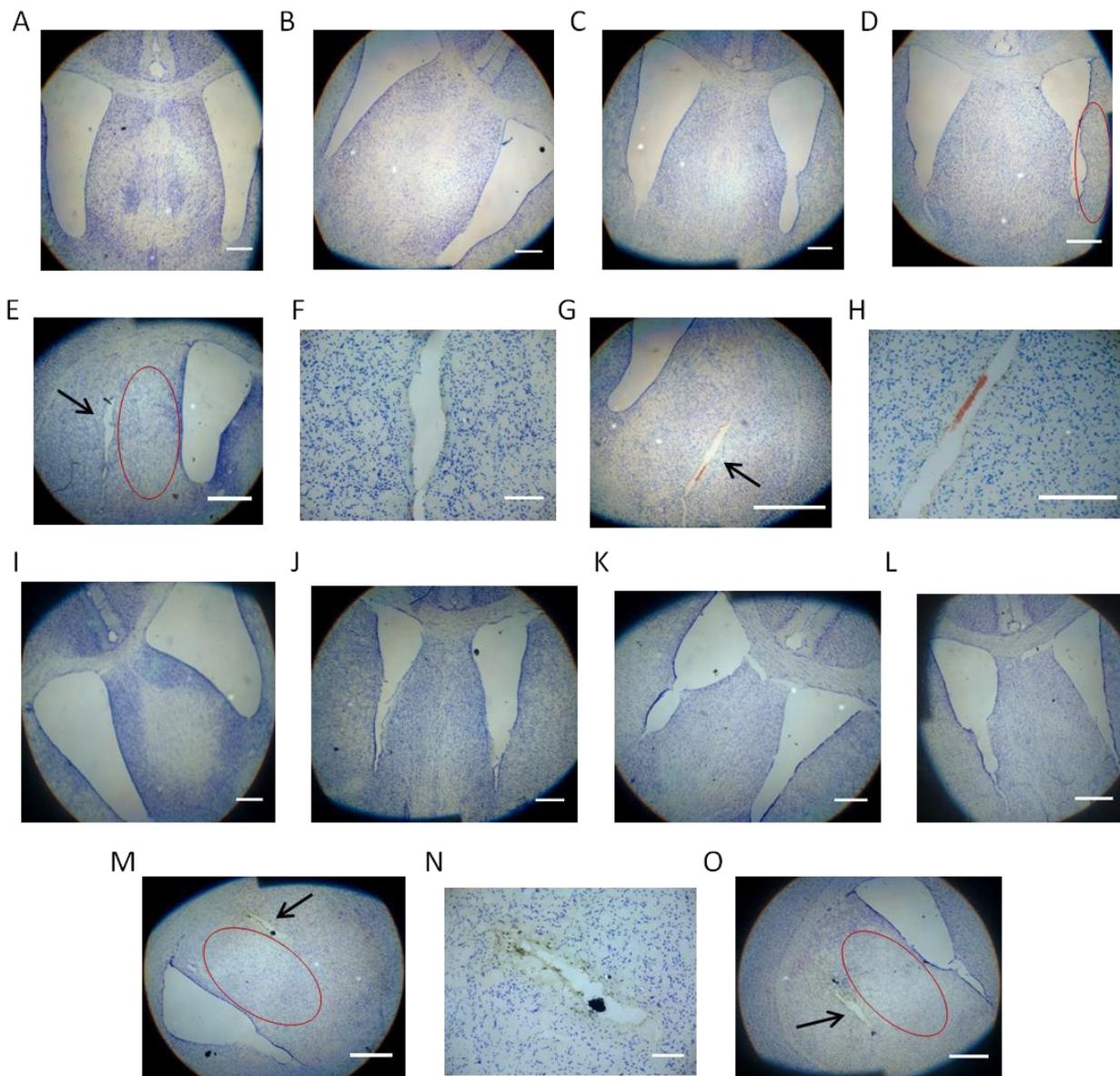


Figura 15. Análise histológica pela coloração de Cresil 24 horas após injeção de heme. Os animais tiveram seus cérebros retirados e preparados para coloração de cresil 24 horas após cirurgia. **(A e B)** os animais controle, injetados com veículo não demonstram lesão, nem diferença celular. Seus ventrículos cerebrais também não tiveram alterações morfológicas. **(C e D)** Os animais injetados com a dose 10 de heme apresentaram alteração no ventrículo do hemisfério injetado, estreitando seu formato. **(D)** Área da lesão contornada em vermelho. **(E)** Os animais submetidos à dose 10 também apresentaram cicatriz, indicada pela seta. A região de injeção ao lado da cicatriz apresentou baixa celularidade – local com contorno vermelho. **(F)** Região da lesão com poucas células ao redor. **(G)** Imagem de um corte cerebral de outro animal que também apresentou cicatriz na região do *striatum* – indicada pela seta. **(H)** Região da cicatriz com baixa celularidade ao redor. **(I e J)** Os animais injetados com a dose 100 demonstraram diferenças no ventrículo do lado injetado, diminuindo seu tamanho e assim alterando sua forma. **(K e L)** Os animais injetados com a dose 1000 de heme também apresentaram diferenças morfológicas nos ventrículos do hemisfério injetado. **(M)** A injeção da dose 1000 também causou lesão na região do *striatum* dos animais – local indicado pela seta. Além disso as células da região estavam afastadas entre si próximo ao local da cicatriz – região contornada em vermelho. **(N)** Região da cicatriz apresentando baixa celularidade ao seu redor. **(O)** Outra cicatriz causada pela injeção da dose 1000– local indicado pela seta. As células da região injetada também afastadas entre si – região contornada em vermelho.

5.3 Avaliação sensório-motora após a injeção de Heme.

5.3.1 Rotarod

Visto que o heme é capaz de causar inflamação e lesão no cérebro dos animais em 24 horas, passamos a realizar testes sensório-motores nos animais por 14 dias para avaliar se a injeção de heme também é capaz de causar déficits comportamentais nos animais, visto que a região utilizada para injeção é responsável por grande parte da função motora e coordenação.

O Rotarod foi o teste utilizado para avaliar a função motora e o equilíbrio nos camundongos. Através de sua corrida em uma esteira em forma de cilindro - que gira a uma velocidade que aumenta gradualmente - foi avaliado o tempo em que o animal consegue se equilibrar e correr sobre ela. Os animais aprendem a correr com os testes, aumentando o tempo de corrida a cada teste realizado. Isso foi observado nos animais sham - a cada dia de corrida eles melhoravam seu tempo significativamente, demonstrando controle das funções motoras e equilíbrio (**Figura 16A**). Os Animais injetados com a menor dose de heme também melhoraram sua corrida, porém não de forma significativa (**Figura 16B**). Os animais injetados com a dose 1 variaram bastante seu tempo de corrida, porém sem nenhuma melhora significativa (**Figura 16C**), assim como os animais injetados com a dose 10 (**Figura 16D**). As maiores doses injetadas demonstraram que os animais ficaram na mesma faixa de tempo de corrida desde o primeiro teste realizado, sem aprendizado e com dificuldades durante a execução da mesma, e muitas vezes se arrastando sobre o cilindro (**Figura 16E e F**).

Ao realizarmos a comparação entre a corrida dos animais das maiores doses (100 e 1000) e a corrida dos animais sham – injetados com o veículo- pudemos observar com mais clareza o efeito da injeção de heme sobre a função motora dos animais, visto que os animais sham aumentam seu tempo de corrida gradualmente, enquanto que os animais injetados com heme ficam na mesma faixa de segundos corridos, ou pioram seu tempo, demonstrando assim, dificuldade em executar sua função motora (**Figura 16G**).

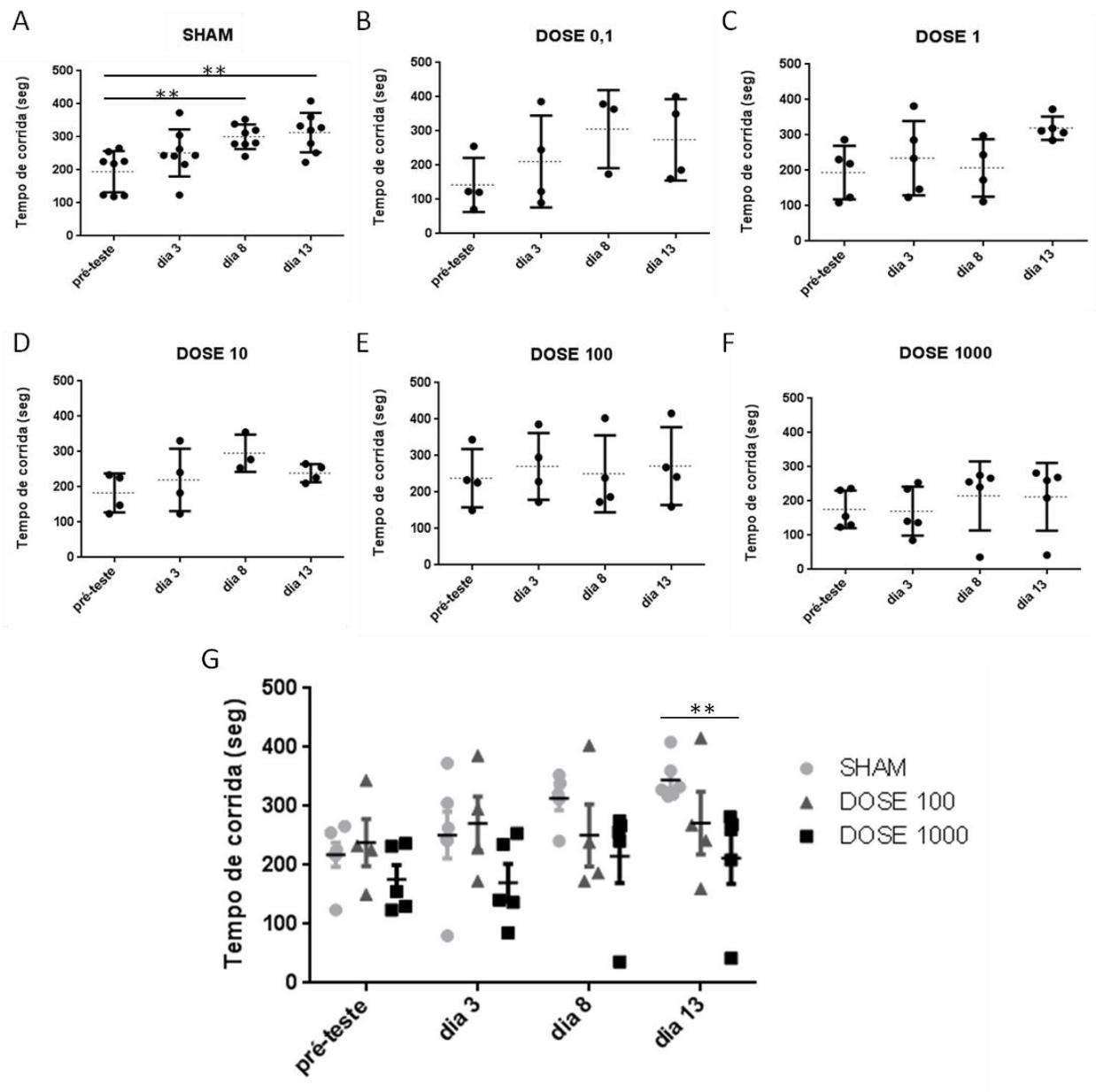


Figura 16. Avaliação da função motora dos animais pelo teste Rotarod. Os animais injetados com (A) veículo (Sham), (B) dose 0,1 de heme, (C) dose 1, (D) dose 10, (E) dose 100 e (F) dose 1000 tiveram sua função motora avaliada pelo tempo de corrida no rotarod. (G) Os animais injetados com as maiores doses tiveram seus tempos de corrida comparados aos do sham. O eixo X indica os dias de corrida, e o eixo Y representa o tempo de corrida em segundos. ** $p < 0,01$,

5.3.2 Body Swing

No teste do body swing passamos a analisar a simetria dos animais através do movimento de elevação do corpo para direita ou esquerda quando suspensos pela cauda. Os animais realizaram um teste quatro dias antes da cirurgia e nos dias 3, 8 e 13 após a indução

da HI. Nesse teste, espera-se que animais normais subam aproximadamente o mesmo número de vezes para ambos os lados, demonstrando simetria. Como forma de análise, quanto mais próximos ao valor 1.0 mais assimétricos os animais estão, e quanto mais próximos de 0,5 mais próximos da normalidade.

Os animais controle (sham) apresentaram valores próximos aos do dia do pré-teste, se mantendo no eixo de simetria até o dia 13 após injeção, demonstrando que a injeção do veículo não interferiu em sua simetria, como esperado (**Figura 17A**). Os animais injetados com a dose 0,1 (10^{16} moléculas de heme), demonstraram uma tendência a assimetria, porém não foi significativamente estatístico (**Figura 17B**). Os animais injetados com a dose 1 (10^{17} moléculas de heme) ficaram assimétricos no terceiro dia após a cirurgia (**Figura 17C**), já os injetados com a dose 10 (10^{18} moléculas de heme) não apresentaram diferenças entre o pré-teste e os testes após HI (**Figura 17D**). Os animais submetidos às maiores doses: 100 e 1000 (10^{19} moléculas e 10^{20} moléculas de heme respectivamente) apresentaram assimetria, além de reclamarem de dor durante a realização dos testes (**Figura 17E e F**).

O teste Tukey *Two-Way* ANOVA revelou diferença significativa na assimetria dos animais injetados com a dose 1 entre o pré-teste e o dia 3; com a dose 100 entre o dia 3 e o dia 13; e na dose 1000 entre o pré-teste e o dia 8, e o pré-teste e dia 13. Os animais injetados com as maiores doses confirmaram essa assimetria observada na análise individual, visto que quando analisados de forma comparativa aos animais sham, mantiveram resultados significativos em relação à taxa de assimetria (**Figura 17G**). Esses resultados confirmam que a injeção de heme nas maiores doses são capazes de afetar o comportamento dos animais, comprometendo suas respectivas simetrias.

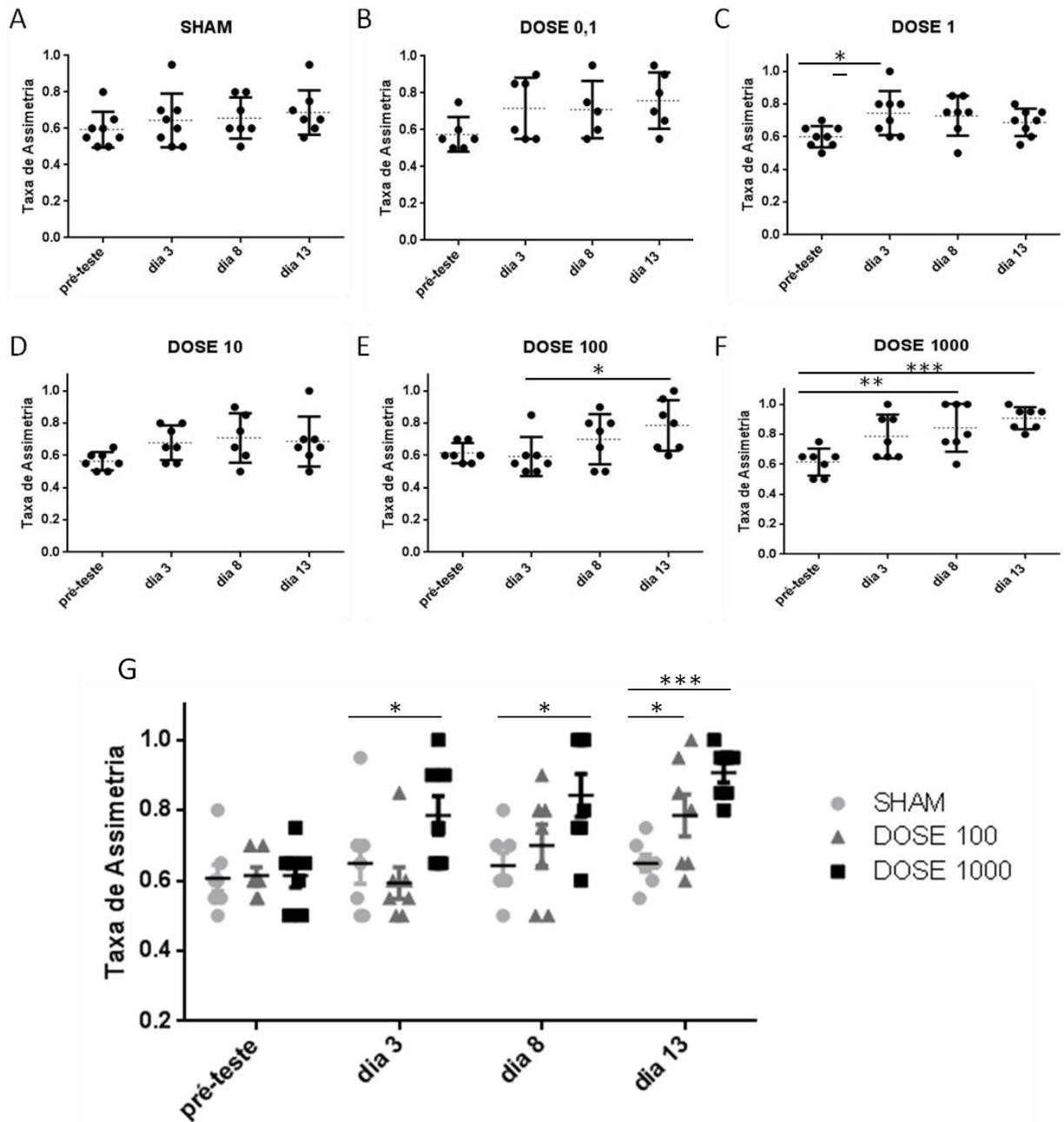


Figura 17. Avaliação da assimetria dos animais pelo teste Body Swing. Os animais injetados com (A) veículo (Sham), (B) dose 0,1 de heme, (C) dose 1, (D) dose 10, (E) dose 100 e (F) dose 1000 tiveram sua taxa de assimetria avaliada pelo body swing. (G) Os animais injetados com as maiores doses foram comparados com os animais sham. O eixo Y indica a taxa de assimetria, portanto quanto mais próximo ao 1.0 mais assimétrico o animal se encontra, enquanto o valor 0.5 representa simetria. O eixo X representa os dias de teste. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.3 Cilindro

Para obter robustez em nossos dados, passamos a avaliar a simetria dos animais por outro teste amplamente utilizado na literatura, o teste do Cilindro. Este teste visa avaliar como está o apoio do animal através dos membros dianteiros para apoio ao explorar o ambiente do cilindro. Aqui, nós avaliamos a preferência pela utilização da pata direita, esquerda ou ambas para a realização desse apoio. O eixo 0.0 representa simetria e equilíbrio nas elevações, enquanto que o valor 0.5 representa assimetria.

Os animais injetados com veículo se mantiveram bem próximos ao valor 0.0 durante todos os dias de testes, demonstrando equilíbrio e simetria conforme esperado (**Figura 18A**). Os animais injetados com a menor dose variam muito, porém a média do grupo tende a aumentar, com tendência a assimetria, mas não é significativo (**Figura 18B**). Os animais submetidos à dose 1 ficam assimétricos após a injeção de heme (**Figura 18C**), enquanto os animais da dose 10 variaram muito, com alguns animais com tendência a assimetria e outros não (**Figura 18D**). O teste dos animais do grupo da dose 100 não teve diferença estatística quando comparados ao pré-teste (**Figura 18E**), porém os animais estavam prostados e alguns não completaram as 20 elevações esperadas durante o período de 10 minutos, assim como os animais do grupo da dose 1000, que também estavam prostados e desestimulados durante a realização do teste. A dose 1000 causou uma assimetria nos animais no terceiro dia após injeção (**Figura 18F**). Ao compararmos os dados dos animais submetidos às maiores doses com os animais sham, notamos que os animais apresentaram assimetria significativamente estatística nos dias 3, 8 e 13 após a injeção de heme (**Figura 18G**). Portanto a injeção de heme quando realizada nas maiores doses também é capaz de causar assimetria pelo teste do Cilindro, confirmando nossos resultados anteriores.

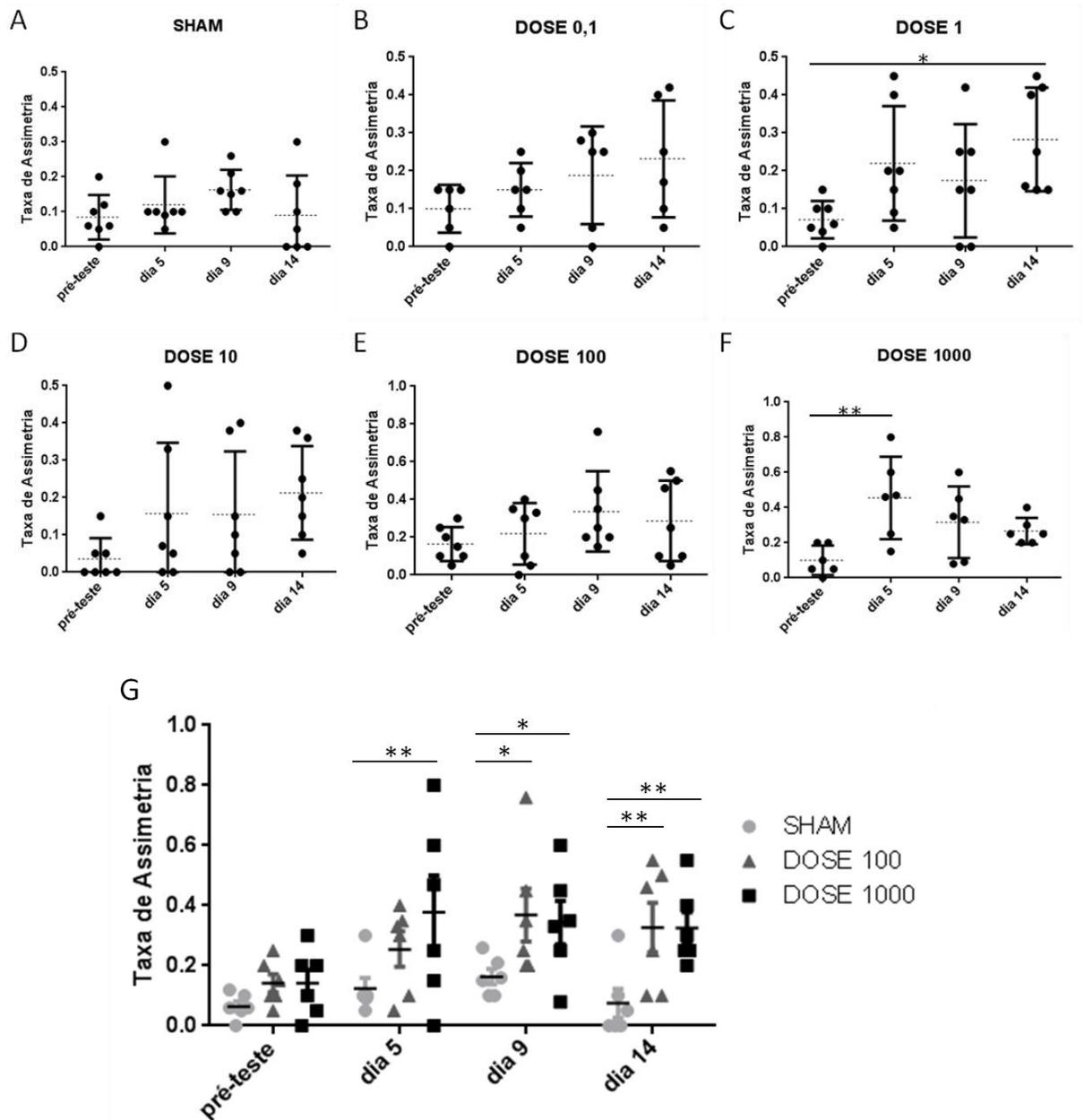


Figura 18. Avaliação da assimetria dos animais pelo teste do Cilindro. Os animais injetados com (A) veículo (Sham), (B) dose 0,1 de heme, (C) dose 1, (D) dose 10, (E) dose 100 e (F) dose 1000 de heme tiveram sua taxa de assimetria avaliada após realização do teste do Cilindro. (G) Os animais das doses 100 e 1000 foram comparados aos dos animais sham. O eixo Y indica a taxa de assimetria, quanto mais próximo ao 1.0 mais assimétrico o animal se encontra, enquanto o valor 0.0 representa simetria. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5.3.4 Corner

O Corner também é um teste que avalia a taxa de assimetria dos animais. Ele se baseia na preferência de lado que o animal tem ao realizar a virada após explorar o ambiente do canto. Foi realizado um pré-teste quatro dias antes da cirurgia para comparar com os dados pós

cirúrgicos realizados nos dias 3, 8 e 13. O corner foi realizado apenas com grupos de maiores doses. A forma de avaliação é a mesma que a do teste body swing, portanto quanto mais próximos os valores de 0.5 mais simétrico o animal está e quanto mais próximos ao valor 1,0 mais assimétrico o animal se encontra.

Os animais controle permaneceram com seus valores próximos aos observados no pré-teste, indicando que a injeção do veículo não interferiu em sua simetria (**Figura 19A**). Já os animais injetados com a dose 100 ficaram assimétricos após a injeção de heme (**Figura 19B**). Os animais do grupo da dose 1000 tiveram valores variados entre si, não apresentando uma assimetria significativa (**Figura 19C**). Quando observados em conjunto, os animais dos grupos das maiores doses não são estatisticamente diferentes dos animais injetados com veículo (**Figura 19D**).

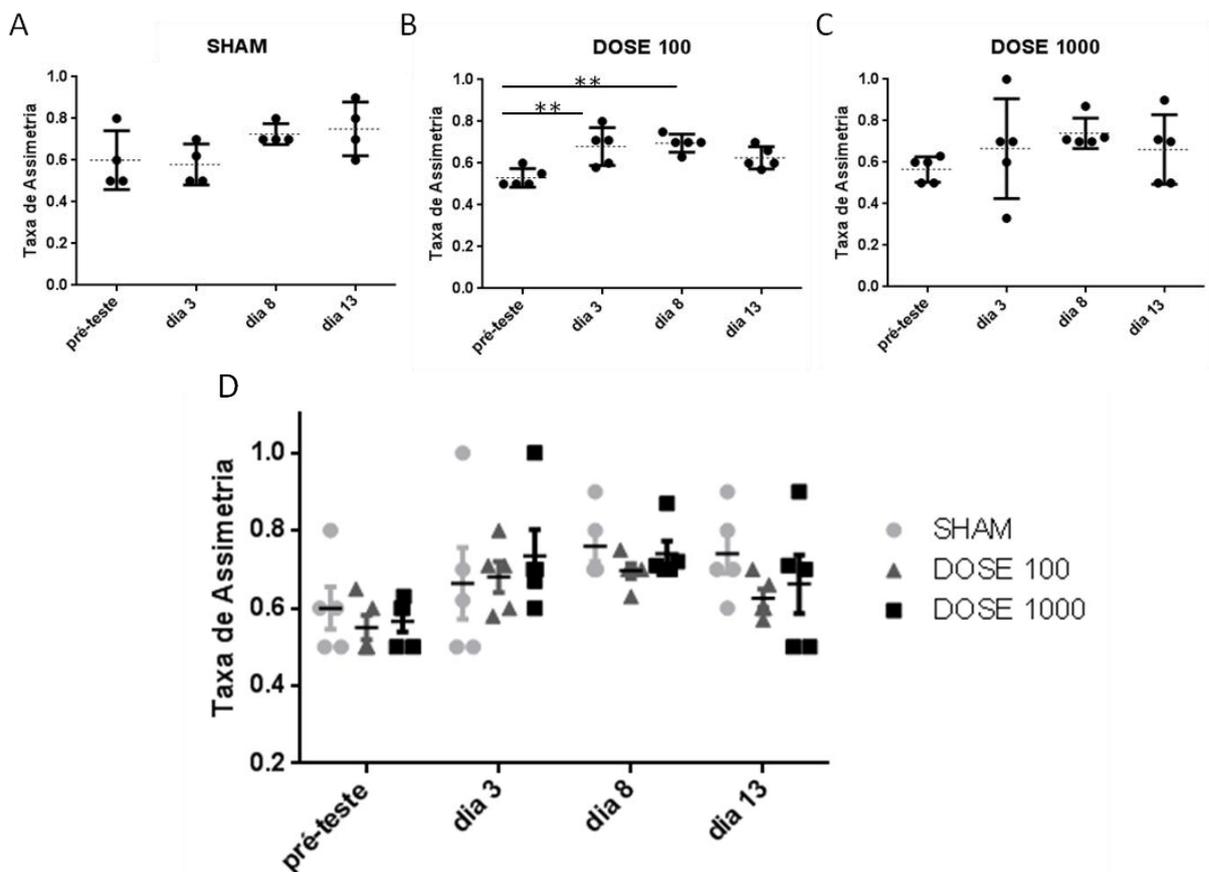


Figura 19. Avaliação da assimetria dos animais pelo teste do Corner. Os animais injetados com (A) veículo (Sham), (B) dose 100 de heme e (C) dose 1000 tiveram sua taxa de assimetria avaliada pelo teste do corner (D) Os animais submetidos as maiores doses de heme foram comparados aos animais sham. O eixo Y indica a taxa de assimetria, portanto quanto mais próximo ao 1.0 mais assimétrico o animal se encontra, enquanto o valor 0.5 representa simetria, já o eixo X representa os dias de teste. ** p<0,01.

5.3.5 Pole Teste

O Pole é um teste simples no qual os animais ficam em uma situação que os obriga a descer um poste vertical sendo possível analisar a coordenação motora dos mesmos. Neste teste o camundongo é colocado no poste voltado para cima, e assim que ele se voltar para baixo e começar a descer, o tempo é cronometrado até ele alcançar a maravalha. Animais normais tendem a segurar no poste com firmeza e descer devagar, muitas vezes girando ao realizar a descida.

Os animais controle fizeram a descida pelo pole na mesma faixa de tempo que realizaram no pré-teste (**Figura 20A**). Os animais injetados com a dose 100 desceram um pouco mais rápido do que o observado no pré-teste, porém não foi significativo (**Figura 20B**). Os animais injetados com a maior dose realizaram a descida aproximadamente no mesmo tempo que o pré-teste (**Figura 20C**). Quando analisados em conjunto, os animais injetados com heme desceram significativamente mais rápido do que os animais injetados com veículo no dia 9 após HI (**Figura 20D**).

Portanto a injeção de heme afetou a coordenação motora dos animais, visto que quando submetidos à HI desceram muito mais rápido que os animais sham, demonstrando falta de firmeza ao segurar o pole e descer sobre ele.

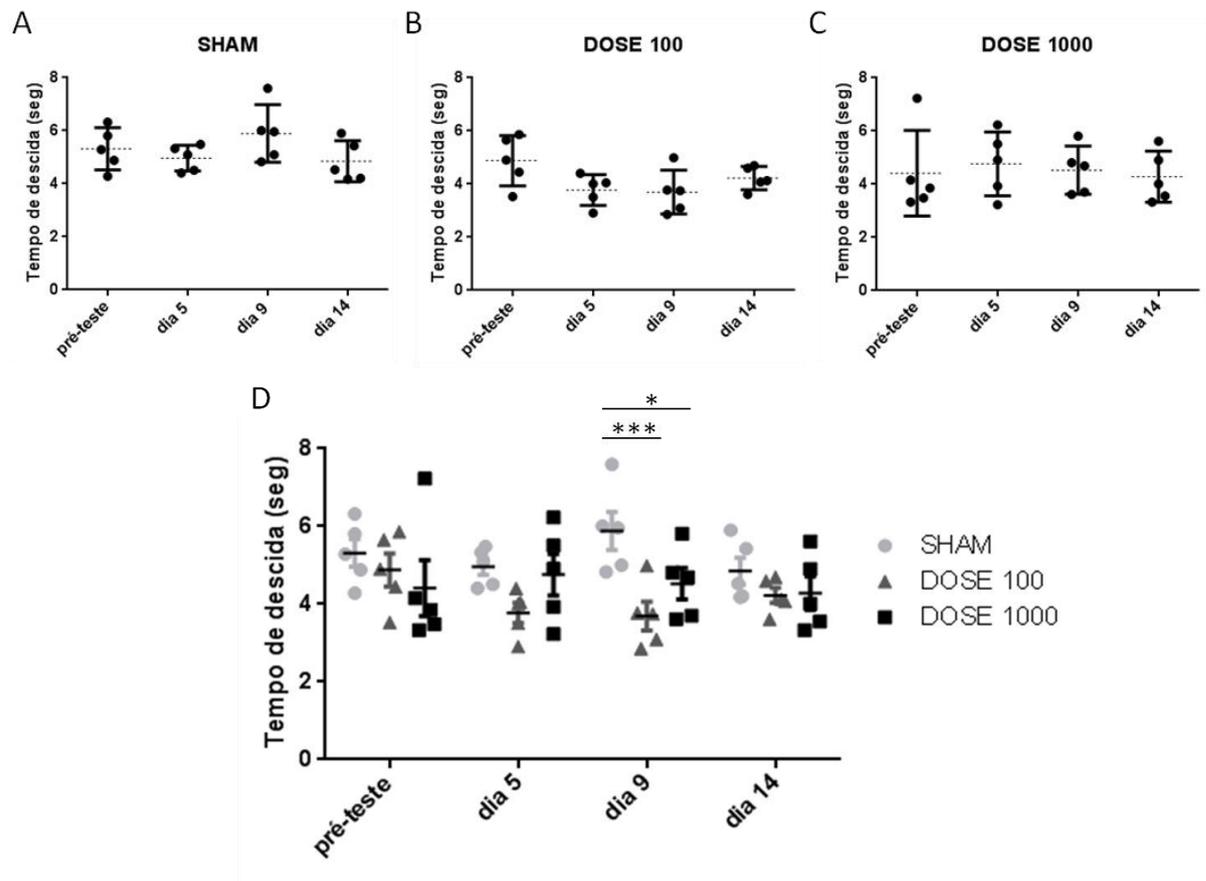


Figura 20. Avaliação da função motora dos animais pelo teste do Pole. Os animais injetados com (A) veículo (Sham), (B) dose 100 de heme e (C) dose 1000 tiveram sua coordenação motora avaliada pelo tempo de descida do teste do pole. (D) Os animais injetados com heme foram comparados com os animais sham. O eixo Y indica tempo de corrida em segundos, e o eixo X os dias de teste. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

5.4 Análise histológica 16 dias após a injeção de Heme.

Após realização dos testes sensório-motores nos animais, fizemos a retirada do cérebro dos mesmos no décimo sexto dia após HI para verificar se havia lesão através da coloração de Cresil. Como citado anteriormente, essa coloração marca retículo endoplasmático rugoso das células, portanto regiões sem coloração não possuem células.

Os animais injetados com o veículo não apresentaram lesão e mantiveram a anatomia dos ventrículos similar ao de um animal não injetado, além disso, a morfologia celular aparece bem corada em ambos os animais (Figura 21A e B). Os animais injetados com a dose 0,1 também não apresentaram lesão, mantendo a região do *striatum* bem similar com a observada nos animais injetados com o veículo (Figura 21C e D). Os animais injetados com a dose 1 de heme apresentaram uma anatomia muito diferente da observada nos animais

injetados com veículo. A região injetada interferiu na morfologia do cérebro na região dos ventrículos, diminuindo seu tamanho quando comparado ao lado direito (**Figura 21E**). O mesmo foi observado em outro animal injetado com a dose 1: a região diminuiu tanto seu tamanho quase ficando imperceptível, além disso, o lado injetado apresentou poucas células na região do *striatum*, com partes não coradas entre elas (**Figura 21F**), os grupos celulares estão afastados entre si, diferentemente do que é observado no lado esquerdo da imagem, no qual as células estão próximas e em grande quantidade. O animal injetado com a dose 10 também mostrou essa diferença celular, apresentando células com espaços em branco entre elas (**Figura 21G**), já o outro animal do grupo dose 10 também teve seu ventrículo alterado após HI (**Figura 21H**). Os animais injetados com a dose 100 de heme também demonstraram diferenças no local da injeção: a morfologia do ventrículo diminuiu, e as células também estavam mais separadas, com espaços bem vazios entre elas, diferente do observado no hemisfério não injetado (**Figura 21I e J**). A região injetada demonstrou uma grande área lesionada, totalmente sem células (**Figura 21J**). As imagens dos cortes cerebrais da dose 1000 não demonstraram uma diferença tão robusta nos ventrículos (como observado nas outras doses) (**Figura 21K e L**), porém esta dose foi a única que apresentou cicatriz no local em que a agulha entrou para realização da injeção (**Figura 21M e N**). O animal injetado com a dose 1000 também apresentou cicatriz em uma região distal à da injeção, mostrando que não apenas a área injetada foi afetada (**Figura 21O**). As células estão bem concentradas e em grande número na região da cicatriz quando comparado com as demais áreas do corte (**Figura 21O e P**).

Portanto, a injeção de heme após 16 dias é capaz de alterar a morfologia dos ventrículos cerebrais e diminuir a celularidade na região injetada. Isso é observado conforme as doses vão aumentando, sendo assim a cicatriz só foi observada na dose 1000.

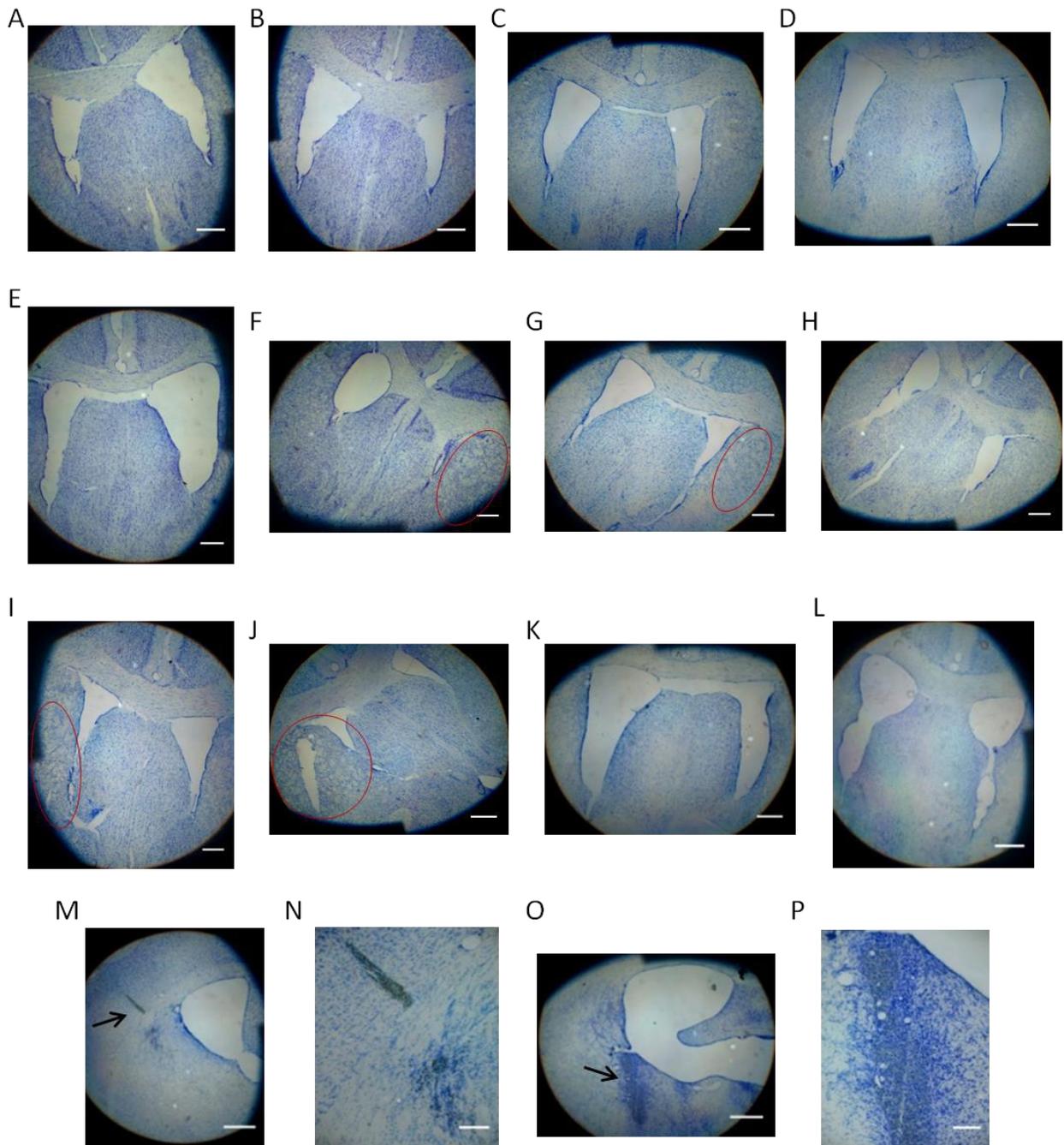


Figura 21. Análise histológica pela coloração de Cresil após 16 dias de cirurgia. Os animais tiveram seus cérebros retirados e preparados para coloração de cresil 16 dias após cirurgia. (A e B) os animais controle, injetados com veículo não demonstram lesão, nem diferença celular. (C e D) Os animais injetados com a dose 0,1 de heme apresentaram imagens similares com os animais controle, sem alteração no ventrículo nem nas células. (E e F) Os animais injetados com a dose 1 demonstraram diferenças no ventrículo do lado injetado, diminuindo seu tamanho e assim alterando sua forma. (F) A região injetada demonstrou alteração na quantidade de células, que se apresentaram mais distantes das outras, com regiões brancas entre elas - região indicada pelo contorno vermelho. (G) Animal injetado com a dose 10 também demonstrou alteração na quantidade celular indicada pelo contorno vermelho, enquanto o (H) outro animal da mesma dose demonstrou uma diminuição no ventrículo do lado que a injeção foi realizada. (I e J) Animais injetados com a dose 100 apresentaram alterações nas células do lado injetado, região contornada em vermelho, mostrando células bem espaçadas e em menor número do que as observadas do lado não injetado. (K e L) Animais injetados com a dose 1000 não apresentaram diferenças robustas na anatomia do ventrículo, porém (M) apresentaram cicatriz na região da injeção indicada pela seta. (N) A região na qual a agulha entrou possui muitos espaços em brancos, com baixa celularidade. (O) Uma região um pouco distal da injeção, porém ainda na área do *striatum* também apresentou cicatriz- indicada pela seta. (P) Essa cicatriz possui muitas células visto a intensidade da coloração, que é diferente das demais regiões do corte.

6. Discussão

O heme é caracterizado como grupamento prostético associado às hemeproteínas, e desenvolve funções fisiológicas essenciais ao organismo. Em casos de hemorragia intracerebral, heme é liberado para o meio extracelular e exerce citotoxicidade através de suas funções oxidativas (Romenina et al. 2006). Além disso, já foi descrito pelo nosso grupo que o heme também é capaz de ativar as células do sistema imune, e assim, promover a inflamação (Dutra e Bozza, 2014). Dentre elas, foi observado que heme é capaz de induzir a ativação do inflamossomo via NLRP3 em macrófagos, sendo também capaz de ativar TLR4, culminando na produção de TNF- α (Dutra et al. 2014; Figueiredo et al. 2007). Levando esses achados em consideração, averiguamos se a injeção de heme na região cerebral do animal também promove inflamação, e observamos isso através da produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-10 e RANTES – citocina atrativa de linfócitos. Nós observamos que 24h após a injeção com heme ocorre processo inflamatório com liberação de IL-1 β e RANTES de forma significativa. Além dessas citocinas pró-inflamatórias nós avaliamos a liberação de TNF- α , porém, o heme não foi capaz de induzir aumento na liberação dessa citocina de forma significativa em relação aos animais injetados com veículo. Um dos motivos para a ausência de significância estatística na liberação de TNF no estímulo com o heme pode ser causado pelo baixo número de animais que utilizamos para a realização desse experimento. Além das citocinas pró-inflamatórias, analisamos também a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Pudemos observar que a injeção de heme induziu a produção dessa citocina em doses significativas. Isso pode ser explicado, pois no momento da inflamação células do sistema imune são ativadas liberando mediadores inflamatórios com intuito de recrutar mais células, aumentando a inflamação. Contudo outras células realizam o suporte no local, liberando citocinas anti-inflamatórias, auxiliando na fagocitose de células mortas, e tentando promover a homeostase (Kigerl et al. 2009). Portanto, a liberação de IL-10 pode contribuir com a ideia que o heme promove inflamação.

O aumento da inflamação observado sugere que o principal elemento presente no heme que o torna apto a realizar atividades deletérias realmente é o ferro, como proposto, visto que a injeção de protoporfirina não foi capaz de liberar quantidades significantes de citocinas, com valores similares ao sham.

Além de promover inflamação, o heme também se mostrou capaz de induzir lesão tecidual em 24 horas após injeção. Pela coloração de Cresil pudemos observar que os animais

injetados com o veículo apresentaram a morfologia dos ventrículos bem semelhante entre eles, diferente do observado nos cérebros dos animais submetidos às maiores doses de heme, os quais tiveram seus ventrículos cerebrais deformados, e com conformações bem diferentes aos observados nos animais sham. Isso pode ser explicado, pois a injeção causou uma intensa morte celular – justificando a baixa celularidade observada, e os espaços em branco presentes na região acometida. As células podem ter morrido por apoptose ou por necrose, afetando células vizinhas que ainda estão viáveis (Sutherland et al. 2011), diminuindo assim a celularidade da região. Essa morte celular pode ter recrutado algumas células que antes estavam próximas ao ventrículo e com sua saída o mesmo ficou deformado. Ademais, a injeção das maiores doses de heme causou uma cicatriz na região injetada, o que indica lesão tecidual, visto que houve morte celular nessa região por se apresentar sem coloração. A região em volta da cicatriz também estava alterada quando comparado ao hemisfério não injetado, apresentando poucas células e muitos espaços em branco. Portanto, a lesão observada segue uma dose dependência visto que os animais injetados com a dose 100 não apresentaram diferenças tão robustas quanto os animais da dose 1000.

Além de observarmos se o heme é capaz de causar lesão cerebral em 24 horas, também observamos se essa lesão se mantém até o décimo sexto dia após HI. Nossos resultados demonstraram que a deformação dos ventrículos observada em 24 horas se manteve até duas semanas nos animais injetados com as maiores doses. Os animais sham e os injetados com a dose 0,1 não apresentaram alterações visíveis nos ventrículos, nem alteração na celularidade. Isso foi de certa forma esperado, visto que essa dose não teve efeitos significativos nos demais resultados, provavelmente devido à baixa quantidade de heme injetada. Isso pode se dever ao fato de as baixas doses de heme serem controladas pelos mecanismos protetores presentes no organismo citados anteriormente. Os animais injetados com as demais doses além de demonstrarem alteração na morfologia dos ventrículos, também apresentaram regiões de baixa celularidade. Diferentemente do observado nos animais em 24 horas após injeção de heme, apenas um animal apresentou cicatriz após 16 dias. Já foi descrito que mesmo após resolução da lesão, o local permanece com uma cavidade onde o tecido foi destruído e que há cicatriz composta por células gliais (Keep et al. 2012). Porém, pelo fato de apenas um animal apresentá-la podemos deduzir que na maioria dos animais um processo robusto de reparo aconteça nos quais a região lesionada se recupera de forma maciça. Além disso, uma outra explicação seria o animal ainda estar em processo de reparo na região, visto que a mesma estava com muitas células - podendo indicar infiltrado inflamatório. Porém, mais estudos precisam ser realizados para compreender melhor essa questão.

No teste do Rotarod, devido aos déficits motores, de equilíbrio e coordenação motora descritos no modelo de HI (Jeong et al. 2003), era esperado que os animais apresentassem dificuldade ao correr, levando à diminuição do tempo da corrida caso o modelo de HI com heme funcionasse. Foi o que observamos em nosso modelo: os animais injetados com a maior dose de heme apresentaram dificuldades em se manter no cilindro rotatório, muitas vezes se arrastavam ao invés de correr, e assim, caíam. Os animais injetados com o veículo aprenderam a realizar a corrida, aumentando seu tempo a cada teste realizado, como descrito na literatura (Balkaya et al. 2013). Na análise, houve diferença significativa entre o sham e a maior dose em apenas um dia de corrida. Vale ressaltar que tivemos um problema com o aparelho durante a realização do experimento, sendo assim, excluímos um número grande de animais. Aumentando o número de animais testados acreditamos que os grupos que ainda não apresentaram diferença estatisticamente significativa, como o da dose 100 também passem a apresentar diferença estatística quando comparados ao sham.

O Body Swing foi o teste de simetria realizado com maior facilidade. Isso pode ser justificado por ser um teste de execução de movimento espontâneo do animal, diferentemente dos demais que conta com a motivação do animal em querer realizar. Esse teste apresentou diferenças significativas nos animais injetados com a dose 1, a dose 100 e a dose 1000 quando analisados individualmente antes e pós injeção. Curiosamente, os animais injetados com a dose 10 não apresentaram tal significância. Apesar do observado, quando comparados os grupos experimentais ao sham, os animais submetidos às doses 100 e 1000 demonstraram maior assimetria. Todos os animais realizaram o teste normalmente, apenas alguns animais das maiores doses reclamavam de dor ao serem erguidos pela cauda e demoraram em realizar os levantamentos, porém realizaram o teste mesmo assim.

Os resultados do teste do cilindro foram similares aos já descritos, visto que os animais injetados com veículo demonstraram tendência a realizar o apoio na mesma proporção de vezes com a pata direita, esquerda ou ambas, sem demonstrar preferência (Hua et al. 2002). Já os animais injetados com heme, demonstraram preferência de lado de apoio, se tornando assimétricos quando comparados ao pré-teste. De início nós acreditávamos que os animais teriam preferência de apoio com a pata dianteira esquerda, visto que realizamos a injeção nesse hemisfério – afetando o controle motor do lado contralateral à lesão. Porém, no decorrer dos testes notamos que não é isso que ocorre. Alguns animais tendem a utilizar o apoio apenas com a pata direita, ou apenas com a esquerda, e em outro dia de teste fazem o contrário. Isso demonstra que o controle do equilíbrio do animal foi afetado, deixando o mesmo assimétrico em relação ao grupo controle, e ao seu próprio teste realizado antes da

injeção. Além de se tornarem assimétricos, os animais das maiores doses também demonstraram falta de motivação para explorar o cilindro, ficando prostrados no centro do ambiente, e muitas vezes não realizam os 20 movimentos de apoio. Esse comportamento não é observado nos animais sham que se mostraram bem ativos explorando o ambiente normalmente e realizando os movimentos rapidamente.

No teste do corner não foi possível observar diferença estatística entre os animais injetados com heme e os injetados com veículo, porém os valores na análise ficaram próximos da significância, portanto se aumentarmos o número de animais desse teste acreditamos que a análise ficará estatisticamente diferente dos animais sham, visto que os animais variaram muito entre si, o que atrapalhou a análise. Além disso, os animais demoraram muito tempo para realizar o movimento de virada, por isso estipulamos de 8-10 movimentos, porém na literatura utilizam de 10-15 (Hua et al. 2002). Os animais também se mostraram acoados e/ou desestimulados em explorar o ambiente do canto, o que dificultou o andamento do teste.

O teste do Pole foi utilizado para avaliar a coordenação motora, os animais que descem muito rápido não conseguem ter firmeza ao segurar no pole, e assim escorregam por ele descendo rapidamente. Isso foi o que observamos nos animais injetados com heme nas maiores doses. Enquanto os animais injetados com veículo realizaram a descida caminhando e até mesmo girando sobre o pole, mostrando coordenação motora e firmeza nos movimentos.

Os resultados dos testes sensório-motores condizem com a lesão observada nos animais injetados com heme, visto que a área injetada é a região do *striatum* - local de indução da HI utilizado pela maioria dos modelos. Essa região é a mais acometida pelo AVE hemorrágico em humanos, correspondendo a área dos gânglios da base, que por ser uma região grande, suporta grandes hematomas assim como os encontrados nos pacientes (MacLellan et al. 2012). Essa área tem como objetivo cuidar para que os movimentos sejam iniciados e terminados no tempo certo e realizados harmonicamente. Além da função motora, essa região cerebral está relacionada com funções emocionais, cognitivas e com a motivação (Lent, 2010). Portanto, comprometendo a celularidade dessa região, foi possível observar danos funcionais e comportamentais nos animais.

Dentre os modelos existentes para estudar a HI está o modelo de injeção de sangue autólogo, criado por Masuda e colaboradores em 1988, no qual o sangue é coletado de um vaso superficial do animal e injetado no cérebro. Outro modelo desenvolvido é o de injeção de colagenase bacteriana – enzima que realiza a digestão do colágeno. Esse modelo foi proposto por Rosenberg e colaboradores em 1990, e nele a hemorragia ocorre em vasos *in situ* imitando a expansão gradual do hematoma. Também há o modelo de microbalão

desenvolvido por Sinar e colaboradores em 1987, neste modelo o objeto de estudo é o efeito de massa. Nele, forma-se o edema, mas os efeitos da presença do coágulo e de elementos do sangue não estão presentes. Por último, existe o modelo de avulsão de vasos cerebrais, que consiste na exposição das veias corticais superficiais pela craniotomia, que são avulsionadas utilizando a ponta de uma agulha, resultando numa hemorragia cortical. Também já foi criado um modelo mais simplificado de HI através da injeção de hemoglobina (Yang et al. 2012), porém os mais utilizados atualmente são o modelo de injeção de sangue autólogo e o de injeção de collagenase.

O modelo proposto nesse trabalho – de indução de HI com a injeção de heme – utilizou camundongos fêmeas, sendo esse um fator que pode influenciar nos resultados, pois muitos trabalhos utilizam machos em detrimento a fêmeas alegando que o ciclo hormonal das mesmas pode aumentar a variabilidade, porém, em ambos os gêneros os hormônios sexuais podem influenciar a progressão da lesão (Gokhale et al. 2015). Foi descrito que a testosterona, dependendo da idade do animal, pode ter papel deletério ou protetor, enquanto que nas fêmeas, o estrogênio apresenta caráter neuroprotetor, e isso é levado em consideração em casos clínicos, já que a menopausa é considerada um fator de risco para o AVE. Portanto, o papel desse hormônio deve ser levado em consideração neste trabalho (Gokhale et al. 2015).

A escolha do uso de fêmeas foi uma das limitações encontradas em nosso trabalho devido a quantidade necessária para realização de todos experimentos propostos, além disso, os próprios animais dificultaram a realização deste trabalho, pois seus dados variavam muito entre si, e alguns reclamavam de dor logo no pré-teste, sendo então excluídos da análise.

Apesar das limitações e do processo ser invasivo aos animais, esse modelo possui como vantagem causar os danos observados na HI com uma menor quantidade de volume injetado. A maior dose injetada tem 6 μ l de volume final, o que interfere menos na pressão intracraniana dos animais quando comparado aos modelos atualmente utilizados em camundongos, que injetam 15 μ l (Sansing et al. 2011). Além disso, grande parte dos trabalhos utilizam apenas três testes sensorio-motores nos animais, nosso trabalho realizou cinco testes dando mais robustez ao resultado final. As doses de heme utilizadas neste trabalho foram estabelecidas pela quantidade aproximada de heme encontrada no modelo de injeção de sangue autólogo utilizada na literatura. Portanto, a dose base é a dose 1 referente a quantidade de heme encontrado em 15 μ l de sangue (10^{17} moléculas), as demais são 10x mais diluída (dose 0,1 - 10^{16} moléculas), 10x mais concentrada (dose 10 - 10^{18} moléculas), 100x mais concentrada (dose 100 - 10^{19} moléculas) e 1000x mais concentrada (dose 1000 - 10^{20} moléculas).

Dada a importância da HI já citada neste trabalho, e a emergência de uma terapia eficaz, ainda são necessários mais estudos para compreender melhor a relação da fisiopatologia da doença com a inflamação e neurodegeneração observada a fim de encontrar novos alvos terapêuticos. Este trabalho teve o objetivo de estabelecer um novo modelo visando a importância do heme como componente mínimo indutor de dano. Dado o modelo, novas questões ainda precisam ser preenchidas para melhor entendimento. Dentre as estratégias terapêuticas, o papel do NLRP3 pode ser estudado melhor, visto que ele parece ser ativado nesse modelo e ser importante para inflamação observada. Além disso, o ferro parece desenvolver papel crucial para essa patologia, sendo um bom alvo para uma futura terapia.

7. Conclusão

A injeção de heme foi capaz de induzir aumento na produção de citocinas no cérebro dos animais, e assim promover inflamação. Além disso a injeção de heme também causou lesão tecidual no cérebro dos animais caracterizada pela morte celular e presença de cicatriz na região injetada, de maneira dose resposta. O heme também foi capaz de promover déficits motores nos animais, dificultando seus movimentos de corrida, e deixando-os assimétricos e sem equilíbrio. Em conclusão sugerimos que o heme é um bom modelo para estudo da HI e parece ter papel fundamental na neuroinflamação e neurodegeneração que é observada nessa patologia.

8. Referências Bibliográficas

- Abbas, A.K. Basic Immunology Updated Edition: Functions and Disorders of the Immune System Ch. 5
- Adeoye, Opeolu, and Joseph P Broderick.(2010). “Reviews Advances in the Management of Intracerebral Hemorrhage.” Nature Publishing Group 6 (11), 593–601.
- Aft, Rebecca L, and Gerald C Muellers.(1984).“Hemin-Mediated Oxidative Degradation of Proteins” The Journal of Biological Chemistry 259, 301-305.
- Aronowski J and Zhao X. (2011). Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. Stroke 42:1781-1786.
- Ascenzi, Paolo, and Mauro Fasano. (2009). “Critical Review Serum Heme-Albumin: An Allosteric Protein” IUBMB Journal 61, 1118–1122.
- Atamna, Hani. (2004). “Heme , Iron , and the Mitochondrial Decay of Ageing” 3: 303–18.
- Balkaya M, Krober M.J, Rex A, Endres M. (2013). Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 33: 330-338.
- Balla, J., Jacob, H. S., Balla, G., Nath, K., Eaton, J. W. e Vercellotti, G. M. (1993). Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 9285-9289.
- Becker K.J, McCarron R.M, Ruetzler C, Laban O, Sternberg E, Flanders K.C, Hallenbeck J.M. (1997). Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10873–10878.
- Belanger, M., Magistretti, P.J., (2009). The role of astroglia in neuroprotection. Dialogues Clin. Neurosci. 11, 281–295
- Biffi A, Anderson CD, Battey TW. (2015). Association between blood pressure control and risk of recurrent intracerebral hemorrhage. JAMA 314: 904–12.
- Bornstein N.M, Aronovich B, Korczyn A.D, Shavit S, Michaelson D.M, Chapman J. (2001).Antibodies to brain antigens following stroke. Neurology 56, 529–530.
- Chamoun, V, A Zeman, K Blennow, P Fredman, A Wallin, G Keir, and G Giovannoni. (2001). “Haptoglobins as Markers of Blood – CSF Barrier Dysfunction: The Findings in Normal CSF” 182: 117–21.
- Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S. e Tolosano, E.(2014). Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. Front Pharmacol 5, 61.
- Chiu, D. T., van den Berg, J., Kuypers, F. A., Hung, I. J., Wei, J. S. e Liu, T. Z. (1996). Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of heme release. Free Radic Biol Med 21, 89-95.
- Coyle JT, Puttfarcken P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science 262, 689 695
- Dambinova S.A, Khounteev G.A, Izykenova G.A, Zavolokov I.G, Ilyukhina A.Y, Skoromets A.A. (2003).Blood test detecting autoantibodies to *N*-methyl-d-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. Clin. Chem. 49, 1752–1762.

- Dong, Beibei, Min Cai, Zongping Fang, Haidong Wei, Fangyun Zhu, Guochao Li, and Hailong Dong. (2013). "Hemopexin Induces Neuroprotection in the Rat Subjected to Focal Cerebral Ischemia." *BMC Neuroscience* 14: 58
- Dong, Xiao-xia, Yan Wang, and Zheng-hong Qin. (2009). "Molecular Mechanisms of Excitotoxicity and Their Relevance to Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases" *Acta Pharmacol Sin*, 30 (4): 379–87.
- Dutra, Fabianno F, and Marcelo T Bozza. (2014). "Heme on Innate Immunity and Inflammation" *Frontiers of pharmacology* 1–21.
- Elseweidy MM, Abd El-Baky AE. (2008). Effect of dietary iron overload in rat brain: oxidative stress, neurotransmitter level and serum metal ion in relation to neurodegenerative disorders. *Ind J Exp Biol* 46, 855-858
- Feigin VL, Krishnamurthi RV, Parmar P, Norrving B, Mensah G.A, Bennett D.A, Barker-Collo S, Moran A.E. (2015). Update on the global burden of ischemic and hemorrhagic stroke in 1990–2013: The GBD 2013 study. *Neuroepidemiology* 45: 161–76.
- Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R, Chugh S, Mensah G.A, Norrving B, Shiue I, Estep K, Cercy K. (2016). Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol* 15: 913–24.
- Felger J.C, Abe T, Kaunzner U.W, Gottfried-Blackmore A, Gal-Toth J, McEwen B.S, Iadecola C, Bulloch K. (2010). Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin. *Brain Behav. Immun.* 24: 724–737.
- Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G. e Soares, M. P. (2008). A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med (Berl)* 86, 1097-1111.
- Figueiredo, R. T., Fernandez, P. L., Mourao-Sa, D. S., Porto, B. N., Dutra, F. F., Alves, L. S., Oliveira, M. F., Oliveira, P. L., Graca-Souza, A. V. e Bozza, M. T. (2007). Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 282, 20221-20229
- Fischer, Lindsey R, and D Glass. (2007). "Axonal Degeneration in Motor Neuron," 431–42.
- Fogelholm, R, K Murros, A Rissanen, and S Avikainen. (2005). "Long Term Survival after Primary Intracerebral Haemorrhage: A Retrospective Population Based Study" *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1534–38.
- Fortes, Guilherme B, Leticia S Alves, Rosane De Oliveira, Fabianno F Dutra, Danielle Rodrigues, Patricia L Fernandez, Thais Souto-padron, et al. (2012). "Heme Induces Programmed Necrosis on Macrophages through Autocrine TNF and ROS Production" *Blood*, 119 (10): 2368–76.
- Galicia, Georgina, Wim Maes, Bert Verbinnen, Ahmad Kasran, Dominique Bullens, Mohamed Arredouani, and Jan L Ceuppens. (2009). "Haptoglobin Deficiency Facilitates the Development of Autoimmune Inflammation," *European Journal of Immunology* 39, 3404-3412.
- Gebel JM Jr, Jauch EC, Brott TG, Khoury J, Sauerbeck L, Salisbury S, Spilker J, Tomsick T.A, Duldner J, Broderick J.P. (2002). Relative edema volume is a predictor of outcome in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 33: 2636–41
- Gilgun-sherki, Yossi, Z I V Rosenbaum, Eldad Melamed, and Daniel Offen. (2002). "Antioxidant Therapy in

Acute Central Nervous System Injury : Current State” *Pharmacological Reviews* 54 (2): 271–84.

Glei, M., Klenow, S., Sauer, J., Wegewitz, U., Richter, K. e Pool-Zobel, B. L. (2006). Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res* 594, 162-171.

Graça-Souza, A. V., Arruda, M. A., de Freitas, M. S., Barja-Fidalgo, C. e Oliveira, P. L. (2002). Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* 99, 4160-4165.

Graversen, Jonas Heilskov, Mette Madsen, and Søren K Moestrup. (2002). “CD163 : A Signal Receptor Scavenging Haptoglobin – Hemoglobin Complexes from Plasma” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 309–14.

Greenberg, D.A. & Jin, K. (2006). Growth factors and stroke. *NeuroRx* 3, 458–465

Guo F.Q.,Li X.J, Chen L.Y, Yang H, Daf H.Y, Wei Y.S. (2006).Study of relationship between inflammatory response and apoptosis in perihematoma region in patients with intracerebral hemorrhage. *Chinese Critical Care Medicine* 18 (5): 290–293.

Gutteridge, John M C, and Ann Smitht. (1988). “Antioxidant Protection by Haemopexin of Haem-Stimulated Lipid Peroxidation” 256: 861–65.

Hamza, Iqbal, and Harry A Dailey. (2012). “Biochimica et Biophysica Acta One Ring to Rule Them All : Traf Ficking of Heme and Heme Synthesis Intermediates in the Metazoans .” *BBA - Molecular Cell Research Elsevier B.V.*: 1617–1632.

Hart RG, Boop BS, Anderson DC.(1995). Oral anticoagulants and intracranial hemorrhage. Facts and hypotheses. *Stroke* 26, 1471-1477.

Hua Y, Schallert T, Keep R.F, Wu J, Hoff J.T, Xi G. (2002). Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat. *Stroke* 33: 2478-2484.

Hvidberg, Vibeke, Christian Jacobsen, Roland K Strong, Jack B Cowland, Søren K Moestrup, and Niels Borregaard. (2005). “The Endocytic Receptor Megalin Binds the Iron Transporting Neutrophil-Gelatinase-Associated Lipocalin with High Affinity and Mediates Its Cellular Uptake” 579: 773–77.

Iadecola C and Anrather J. (2011) .The immunology of stroke:from mechanisms to translation. *Nat.Med.*17: 796–808.

Jeong Sw, Chu K, Jung Kh, Kim Su, Kim M, Roh Jk., (003). Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage, *Stroke.*34 (9): 2258-2263

Jeyaraj D Pandian, Seana L Gall, Mahesh P Kate, Gisele S Silva, Rufus O Akinyemi, Bruce I Ovbiagele, Pablo M Lavados, Dorcas B C Gandhi, Amanda G Thrift.(2018). Prevention of stroke: a global perspective. *Stroke* 39: 1269-1278.

Jones BJ, Roberts DJ.(1968). A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259 (2): 211

- Kagan A, Harris BR, Winkelstein W Jr, Johnson KG, Kato H, Syme SL, Rhoads GG, Gay ML, Nichaman MZ, Hamilton HB, Tillotson J. (1974). Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: demographic, physical, dietary and biochemical characteristics. *J Chronic Dis* 27:345-64.
- Keep, Richard F, Ya Hua, and Guohua Xi. (2014). "Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets" NIH Public Access. *Lancet Neurol* 11 (8)
- Keep R.F, Zhou N, Xiang J, Jelkovic A.V, Hua Y, Xi G. (2014). Vascular disruption and blood brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage. *Fluids and Barriers of the CNS* 11:18.
- Kigerl K.A, Gensel J.C, Ankeny D.P, Alexander J.K, Donnelly D.J, Popovich P.G. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 29: 13435–13444.
- Kleinschnitz C, Schawab N, Kraft P, Hagedorn I, Dreykluff A, Schawarz T, Austinat M, Nieswandt B, Wiendl H, Stoll G. (2010). Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood* 115, 3835–3842.
- Knight, Andrew T, Richard M Cowling, Mathieu Rouget, Andrew Balmford, Amanda T Lombard, and Bruce M Campbell. (2008). "Knowing But Not Doing: Selecting Priority Conservation Areas and the Research – Implementation Gap" *22 (3):* 610–17.
- Kono, H. & Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 279–289.
- Korolnek, Tamara, and Iqbal Hamza. (2016). "Blood Spotlight Macrophages and Iron Trafficking at the Birth and Death of Red Cells" *Blood* 125 (19): 2893–98.
- Law, M R, J K Morris, and N J Wald. (2009). "Use of Blood Pressure Lowering Drugs in the Prevention of Cardiovascular Disease : Meta-Analysis of 147 Randomised Epidemiological Studies."
- Lee, M.C., Heaney, L.M., Jacobson, R.L., and Klassen, A.C. (1975). Cerebrospinal fluid in cerebral hemorrhage and infarction. *Stroke* 6, 638–641.
- Lent, R, Cem Bilhões de Neurônios. (2010). *Conceitos Fundamentais de Neurociência, 2ª Edição*, Atheneu Rio
- Liao B, Zhao W, Beers D.R, Henkel J.S, Appel S.H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model. *Exp. Neurol.* 237:147–152.
- Lin S, Qing Yin, Qi Zhong, Feng-Lin, Yu Zhou, Jing-Qi Li, Jing-Zhou Wang, Bing-yin Su^{4*} and, Qing-Wu Yang. (2012). Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *Lin et al. Journal of Neuroinflammation*, 9:46
- Liu, D.Z., Ander, B.P., Xu, H., Shen, Y., Kaur, P., Deng, W. (2010). Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury. *Ann. Neurol.* 67, 526–533
- Maclellan CI, Paquette R, Colbourne F. (2012). A critical appraisal of experimental intracerebral hemorrhage research. *J Cereb Blood Flow Metab.* 32 (4): 612-627.
- Masuda, T., Dohrmann, G. J., Kwaan, H. C., Erickson, R. K., & Wollman, R. L. (1988). Fibrinolytic activity in experimental intracerebral hematoma. *Journal of Neurosurgery*, 68(2), 274–278.

- Mauk, Marcia R, Federico I Rosell, Barbara Lelj-garolla, Geoffrey R Moore, and A Grant Mauk. (2005). "Metal Ion Binding to Human Hemopexin " 1864–71.
- Mayer SA, Sacco RL, Shi T, Mohr JP.(1994). Neurologic deterioration in noncomatose patients with supratentorial intracerebral hemorrhage. *Neurology* 44: 1379–84.
- Mayer, Stephan A. (2003). "Ultra-Early Hemostatic Therapy for Intracerebral Hemorrhage" *Stroke* 34, 224-229
- Mayer, Stephan A, and Fred Rincon. (2005). "Treatment of Intracerebral Haemorrhage" *The Lancet Neurology* 4, 662-672.
- Mazzola, Daiane, Janaine Cunha Polese, Rodrigo Costa Schuster, and Sheila Gemelli Oliveira. (2007). "Perfil dos pacientes acometidos por acidente vascular encefálico assistidos na clínica de fisioterapia neurológica da universidade de passo fundo." *RBPS* 20 (1): 22–27.
- Mcculloch, Kathryn M, Emilianne K Mccranie, Jarrod A Smith, Maruf Sarwar, and Jeannette L Mathieu. (2015). "Oxidative Cyclizations in Orthosomycin Biosynthesis Expand the Known Chemistry of an Oxygenase Superfamily" *PNAS* 112 (37): 11547-11552 .
- Medzhitov, Ruslan. (2008). "Origin and Physiological Roles of Inflammation" *Nature* 454, 428-435 .
- Morello, Noemi, Federico Tommaso Bianchi, Paola Marmioli, Elisabetta Tonoli, Virginia Rodriguez, Lorenzo Silengo, Guido Cavaletti, Alessandro Vercelli, and Fiorella Altruda. (2011). "A Role for Hemopexin in Oligodendrocyte Differentiation and Myelin Formation" *Plos One* 6 (5) e20173.
- Mracsko, Eva, and Roland Veltkamp. (2014). "Neuroinflammation after Intracerebral Hemorrhage" *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:388.
- Munakata, M., Shirakawa, H., Nagayasu, K., Miyahara, J., Miyake, T., Nakagawa, T., Katsuki, H., Kaneko, S., (2013). Transient receptor potential canonical 3 inhibitor Pyr3 improves outcomes and attenuates astrogliosis after intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* 44, 1981–1987.
- Neves, Afonso Carlos, Marcia Maiumi Fukujima, Pedro Antonio De Jesus, Clélia Maria Franco, and Sissy Veloso Fontes. (2002). "Custos Do Paciente Com Acidente Vascular Cerebral No Setor de Emergência Do Hospital São Paulo" *Revista Neurociências* 10 (3): 137–40
- Nunes S, Pereira C, Silva MG (2005).Evolução funcional de utentes após AVC nos primeiros seis meses após a lesão. *Brazilian Journal of Health* 2, 104-114.
- O'Sullivan, Susan B, Schmitz Thomas J.(2004) *Fisioterapia: avaliação e tratamento*. 3ªed. Rio de Janeiro: Manole
- Otterbein, Leo E, Andreas Hedblom, Clair Harris, Eva Csizmadia, David Gallo, and Barbara Wegiel. (2011). "Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide Modulate DNA Repair through Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) Protein" *PNAS* 108 (35): 14491-14496 .
- Paoli, M., Anderson, B. F., Baker, H. M., Morgan, W. T., Smith, A. e Baker, E. N. (1999). Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. *Nat Struct Biol* 6, 926-931.

- Pazos, M., Andersen, M. L. e Skibsted, L. H. (2008). "Heme-mediated production of free radicals via preformed lipid hydroperoxide fragmentation". *J Agric Food Chem* 56, 11478-11484.
- Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO. (2014). Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* 94: 119-126
- Polese, Janaíne Cunha, Aline Tonial, Fabíola Kotz Jung, Rafael Mazuco, Sheila Gemelli De Oliveira, and Rodrigo Costa Schuster. (2008). "Avaliação Da Funcionalidade de Indivíduos Acometidos Por Acidente Vascular Encefálico". *Revista Neurociências* 16 (3): 175–78.
- Pontes-neto, Octávio M, Jamily Oliveira-filho, Raul Valiente, Maurício Friedrich, Bruno Pedreira, Bruno Castelo, Branco Rodrigues, Bernardo Liberato, Gabriel Rodriguez, and De Freitas. (2009). "Diretrizes para o manejo de pacientes com hemorragia intraparenquimatosa cerebral espontânea" *SciELO*, 67: 940–50.
- Ponka P. Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 318: 241-256 (1999).
- Poon MT, Fonville AF, Al-Shahi Salman R. (2014). Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85: 660–67.
- Porto BN, Alves LS, Fernández PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graça-Souza AV, Bozza MT. (2007). Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem*, 282 (33): 24430-6.
- Qureshi AI, Giles WH, Croft JB. (1999). Racial differences in the incidence of intracerebral hemorrhage: effects of blood pressure and education. *Neurology*, 52: 1617-21.
- Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. (2001). Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*, 344: 1450-1460.
- Qureshi, Adnan I, Stanley Tuhim, Joseph P Broderick, Hunt Batjer, Hideki Hondo, and Daniel F Hanley. (2001). "Spontaneous Intracerebral Hemorrhage". *The New England Journal of Medicine* 344 (19): 1450-1460
- Ransohoff R.M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 353: 6301.
- Rocklin, R.E., Sheremata, W.A., Feldman, R.G., Kies, M.W. & David, J.R. (1971). The Guillain-Barré syndrome and multiple sclerosis. *In vitro* cellular responses to nervous tissue antigens. *N. Engl. J. Med.* 284, 803–808.
- Roediger, Ben, and Patricia J Armati. (2003). "Oxidative Stress Induces Axonal Beading in Cultured Human Brain Tissue". *Neurobiology of Disease* 13, 222-229.
- Rosenberg Ga, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. (1990). Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats, *Stroke*, 21(5):801-807.
- Roumenina, Lubka T, Julie Rayes, Sébastien Lacroix-desmazes, and Jordan D Dimitrov. (2016). "Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases." *Trends in Molecular Medicine* 22 (3). Elsevier Ltd: 200–213.
- Sangha, Navdeep, and Nicole R Gonzales. (2011). "Treatment Targets in Intracerebral Hemorrhage". *Neurotherapeutics* 8 (3): 374–87.

- Sansing L.H, Scott E, Kasner L.M, Agarwal P, Welsh F.A, Kariko K.(2011). Autologous Blood Injection to Model Spontaneous Intracerebral Hemorrhage in Mice. *J Vis Exp*.(54): 2618
- Schmitt, T. H., Frezzatti, W. A., Jr. e Schreier, S. (1993). Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch Biochem Biophys* 307, 96-103.
- Shiratori M, Tozaki-Saitoh H, Yoshitake M, Tsuda M, Inoue K. (2010). P2X7 receptor activation induces CXCL2 production in microglia through NFAT and PKC/MAPK pathways. *J. Neurochem.* 114, 810–819.
- Sinar Ej, Mendelow Ad, Graham Di, Teasdale Gm. (1987). Experimental intracerebral hemorrhage: effects of temporary mass lesion, *J Neurosurg.*, 66 (4):568-576.
- Soares, Miguel P, and Iqbal Hamza. (2016). “Review Macrophages and Iron Metabolism.” *Immunity* 44 (3). Elsevier Inc.: 492–504.
- Sofroniew, M.V., (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11, 400–407.
- Spagnuolo, Maria Stefania, Bernardetta Maresca, Maria Pina Mollica, Gina Cavaliere, Carolina Cefaliello, Giovanna Trinchese, Maria Grazia Esposito, et al. (2014). “Haptoglobin Increases with Age in Rat Hippocampus and Modulates Apolipoprotein E Mediated Cholesterol Trafficking in Neuroblastoma Cell Lines” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, 1–13.
- Stokes M.(2000).*Neurologia para Fisioterapeutas*. Editora Premier
- Sutherland, Brad A, Michalis Papadakis, Ruo-li Chen, and Alastair M Buchan. (2011). “Cerebral Blood Flow Alteration in Neuroprotection Following Cerebral Ischaemia”. *J Physiol* 589.17: 4105–14.
- Suzuki, Kazuo, Takashi Kutsuzawa, Kyouji Takita, Masashi Ito, Tetsuya Sakamoto, Akihiko Hirayama, Takayuki Ito. (1987). “Clinico-Epidemiologic Study of Stroke in Akita, Japan”. *Stroke* 18 (2): 402–7.
- Swanson, R.A., Ying, W., Kauppinen, T.M., (2004). Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr. Mol. Med.* 4, 193–205
- Tanaka, Heizo, Yutaka Ueda, Masayuki Hayashi, Chigusa Date, Terumi Baba, Hidetoshi Yamashita, Kunio Owada, Hironobu Shoji, Yukari Tanaka, and Roger Detels. (1982). “Risk Factors for Cerebral Hemorrhage and Cerebral Infarction in a Japanese Rural Community” *Stroke* 13(1): 62-73.
- Tejima, E., Zhao, B.Q., Tsuji, K., Rosell, A., van Leyen, K., Gonzalez, R.G., Montaner, J., Wang, X., Lo, E.H., (2007). Astrocytic induction of matrix metalloproteinase- 9 and edema in brain hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 460–468
- Teunissen, C E, M P J Van Boxtel, H Bosma, E Bosmans, J Delanghe, and C De Bruijn. (2003). “Inflammation Markers in Relation to Cognition in a Healthy Aging Population” *J Neuroimmunology* 134(1-2): 142–50.
- Todorich, Bozho, Juana M Pasquini, Corina I Garcia, Pablo M Paez, and James R Connor. (2009). “Oligodendrocytes and Myelination: The Role of Iron” *Glia* 57 (5): 467–78.
- Wagener, F. A., da Silva, J. L., Farley, T., de Witte, T., Kappas, A. e Abraham, N. G. (1999). Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 291, 416-423.

Wagener, F. A., Eggert, A., Boerman, O. C., Oyen, W. J., Verhofstad, A., Abraham, N. G., Adema, G., van Kooyk, Y., de Witte, T. e Figdor, C. G. (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98, 1802-1811.

Wagner KR, Xi G, Hua Y.(1996). Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter. *Stroke* 27:490-7.

Wagner KR, Xi G, Hau Y, Kleinholz M, de Courten-Myers GM, Myers RE.(1998). Early metabolic alterations in edematous perihematomal brain regions following experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 88:1058-65

Wang, Jian. (2010). "Progress in Neurobiology Preclinical and Clinical Research on Inflammation after Intracerebral Hemorrhage." *Progress in Neurobiology* 92 (4). Elsevier Ltd: 463–77.

Yang S, Chen Y, Deng X, Jiang W, Li B, Fu Z. (2013) .Hemoglobin-induced nitric oxide synthase overexpression and nitric oxide production contribute to blood-brain barrier disruption in the rat. *J. Mol.Neurosci.* 51, 352–363.

Yilmaz A, Fuchs T, Dietel B, Altendorf R, Cicha I, Stumpf C, Schellinger P.D, Blumckel I, Schawab S, Daniel W.G, Garlich C.D, Kollmar R. (2009). Transient decrease in circulating dendritic cell precursors after acute stroke: potential recruitment into the brain. *Clin. Sci. (Lond.)* 118, 147–157

Zhao, Xiurong, Shen Song, Guanghua Sun, Roger Strong, Jie Zhang, James C Grotta, and Jaroslaw Aronowski. (2009). "Neuroprotective Role of Haptoglobin after Intracerebral Hemorrhage". *J Neuroscience* 29 (50): 15819–15827.