



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

EFEITOS CELULARES, HISTOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DA
HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EXPERIMENTAL EM RATOS

JULIANA DALIBOR NEVES

Porto Alegre, 2015



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

EFEITOS CELULARES, HISTOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DA
HEMORRAGIA INTRACEREBRAL EXPERIMENTAL EM RATOS

JULIANA DALIBOR NEVES

Orientador: Carlos Alexandre Netto

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Fisiologia.

Porto Alegre, 2015

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto pela oportunidade e ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório e amigos Edu, Fabrício, Felipe, Cláudia, Luz, Marília e Dirceu, pela descontração, apoio, ajuda e as várias dicas e ensinamentos. Ter convivido com vocês me fez crescer pessoalmente e profissionalmente. Admiro a alegria, a dedicação e a coragem de vocês, por não se deixarem abater e sempre estarem de bom humor.

A prof^a Angela Wyse e prof^o Carlos Alberto Gonçalves e seus alunos, em especial, Felipe, André e Adri, pela colaboração e parceria de trabalho. Obrigada pelo apoio, incentivo e ensinamentos.

Ao querido Régis Mestriner pela maravilhosa ajuda e colaboração, pela paciência, o otimismo e bom humor e mais do que tudo, pela grande amizade, obrigada.

Aos meus pais, Dóris e Aécio e familiares pelo carinho incondicional e por sempre acreditarem em mim. Obrigada pela paciência e compreensão, pelas ausências e pelo tempo limitado. Obrigada por me ensinar a nunca desistir e sempre aprender com os próprios erros. Sou muito abençoada pela família que tenho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| APRESENTAÇÃO..... | v |
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| LISTA DE TABELAS | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | viii |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT | x |
| INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 1.1 HEMORRAGIA INTRACEREBRAL | 12 |
| 1.2. INTERAÇÃO ENTRE MICROGLIA E ASTRÓCITO..... | 21 |
| 1.3. O PAPEL DO ASTRÓCITO NA INFLAMAÇÃO E MORTE NEURONAL | 21 |
| 1.4. O PAPEL DA PROTEÍNA S100B NA PATOFISIOLOGIA DA HIC..... | 24 |
| 1.5. ESTRESSE OXIDATIVO NA HIC | 26 |
| 1.6. EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA APÓS A HIC | 27 |
| 1.7. MODELOS ANIMAIS DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL..... | 28 |
| OBJETIVOS..... | 30 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 31 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 31 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS | 33 |
| 3.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL..... | 355 |
| 3.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA..... | 36 |
| 3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS..... | 37 |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 453 |
| RESULTADOS | 44 |
| 4.1 CAPÍTULO 1 | 45 |
| 4.2 CAPÍTULO 2..... | 55 |
| DISCUSSÃO | 61 |
| CONCLUSÃO..... | 74 |
| PERSPECTIVAS..... | 76 |
| REFERÊNCIAS | 78 |
| ANEXO | 103 |

APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por:

1. Introdução, onde está o embasamento teórico necessário para a compreensão da proposta de trabalho e objetivos.

2. Objetivos, onde se encontram todas as metas a serem desenvolvidas ao longo dos capítulos.

3. Métodos, onde se descreve todas as abordagens metodológicas utilizadas ao longo dos capítulos.

4. Resultados, constituídos pelos capítulos 1 e 2:

Capítulo 1, referente ao artigo submetido à revista *Neuroscience*.

Capítulo 2, referente aos resultados suplementares sobre o estado oxidativo e excitotoxicidade durante a progressão da HIC.

4. Discussão, que contém uma interpretação dos resultados apresentados nos dois capítulos, englobando-os em um contexto geral.

7. Conclusões.

8. Perspectivas, que abordam as possibilidades futuras de pesquisas relativas à continuação deste trabalho.

9. Referências, onde estão listadas todas as referências bibliográficas utilizadas na Introdução e Discussão deste trabalho.

10. Anexo, onde se encontra o artigo submetido à revista *Neuroscience*.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

| | |
|--|----|
| Figura 1. Sequência da lesão neural iniciada pela hemorragia intracerebral..... | 15 |
| Figura 2. Inflamação induzida pela hemorragia intracerebral..... | 18 |
| Figura 3. Vias de sinalização que ativam a microglia após a hemorragia intracerebral. | 20 |
| Figura 4. Representação esquemática dos efeitos extracelulares da S100B no encéfalo. | 25 |

Materiais e Métodos

| | |
|-------------------------------------|----|
| Figura 5. Desenho experimental..... | 34 |
|-------------------------------------|----|

Capítulo 1

| | |
|---|----|
| Figura 6. Efeito da HIC sobre o escore neurológico, teste de preensão e teste do cilindro nos diferentes tempos pós-lesão no estriado ipsilesional..... | 47 |
| Figura 7. Efeito da HIC sobre o volume da lesão. | 48 |
| Figura 8. Efeito da HIC sobre a expressão de S100B no soro, LCE, estriado e córtex..... | 49 |
| Figura 9. Efeito da HIC sobre a expressão de GFAP no estriado e córtex..... | 50 |
| Figura 10. Efeito da HIC sobre as células neuronais, apoptóticas e gliais no estriado..... | 52 |
| Figura 11. Efeito da HIC sobre as células gliais no córtex. | 53 |

Capítulo 2

| | |
|--|----|
| Figura 12. Efeito da HIC sobre o estresse oxidativo no estriado | 56 |
| Figura 13. Efeito da HIC sobre as enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase no estriado..... | 57 |
| Figura 14. Efeito da HIC sobre a glutathione reduzida no estriado.. | 58 |
| Figura 15. Efeito da HIC sobre os níveis de TNF- α no estriado..... | 59 |
| Figura 16. Efeito da HIC sobre a atividade da glutamina sintetase no estriado | 59 |
| Figura 17. Efeito da HIC sobre a captação de glutamato nos diferentes tempos pós-lesão no estriado ipsilesio..... | 60 |

LISTA DE TABELAS*Capítulo 1*

Tabela 1. Interações da S100B sobre variáveis comportamentais e bioquímicas.....54

Capítulo 2

Tabela 2. Interações do estresse oxidativo sobre a atividade da glutamina sintetase (GS) e os níveis de TNF- α60

LISTA DE ABREVIATURAS

- AQP4:** Canal de aquaporina 4
- AVE:** Acidente vascular encefálico
- BHE:** Barreira hemato-encefálica
- CAT:** Catalase
- DAMP:** Padrão molecular associado ao perigo
- DCF:** Composto fluorescente diclorofluoresceína
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- ERK 1/2:** Cinase regulada por sinal extracelular
- ERO:** Espécie reativa de oxigênio
- GFAP:** Proteína glial fibrilar ácida
- GPx:** Glutathione peroxidase
- GS:** Glutamina sintetase
- GSH:** Glutathione reduzida
- HIC:** Hemorragia intracerebral
- IL-1 β :** Interleucina 1 β
- IL-6:** Interleucina 6
- iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível
- LCE:** Líquido cérebro-espinhal
- LIF:** Fator inibitório da leucemia
- MAP2:** Proteína 2 associada ao microtúbulos
- MHC:** Complexo principal de histocompatibilidade
- MMP:** Metaloproteinase
- RAGE:** Receptor para produtos finais de glicação avançada
- SNC:** Sistema nervoso central
- SOD:** Superóxido dismutase
- TBARS:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TGF- α :** Fator de crescimento transformante alfa
- TH:** Transformação hemorrágica
- THIC:** Transformação para hemorragia intracerebral
- TNF- α :** Fator de necrose tumoral α
- tPA:** Ativador de plasminogênio tecidual

RESUMO

A hemorragia intracerebral (HIC) é uma das principais causas de mortalidade em todo mundo, desencadeando eventos adversos e déficits neurológicos graves. A partir disso, essa tese teve como objetivo avaliar as respostas celulares e suas interações envolvidas na HIC e investigar os possíveis mecanismos que contribuem para os déficits sensório-motores relacionados, principalmente, à habilidade dos membros anteriores dos animais. Para isso foram realizados dois experimentos. Em ambos os animais de 90 dias foram submetidos à HIC induzida por colagenase no estriado dorsolateral. No primeiro experimento, após 24h, 72h e 7 dias os animais foram avaliados funcionalmente, e histologicamente quanto ao volume da lesão. Ainda, durante 6h, 24h, 72h e 7 dias, o estriado e o córtex foram avaliados quanto ao número de células neuronais, gliais, e em apoptose; a expressão de GFAP e S100B, no estriado e no córtex, a secreção de S100B, no soro e líquido cérebro-espinhal (LCE). A HIC provocou déficits sensório-motores e perda tecidual; induziu morte neuronal e gliose reativa no estriado. O córtex obteve uma resposta astrocitária similar, mas quanto à microglia houve um aumento apenas em 6h. A S100B correlacionou-se positivamente com o número de células gliais; e negativamente com a força e função dos membros anteriores dos animais lesados. No segundo experimento, foram avaliados o estado oxidativo, o nível de TNF- α , a atividade da glutamina sintetase (GS) e a captação de glutamato nos tempos de 6h, 24h, 72h e 7 dias pós-lesão. Após 6h da HIC houve aumento no nível de TNF- α e excitotoxicidade glutamatérgica; entretanto, a função de *clearance* astrocitário foi restabelecida 7 dias após o dano. A HIC gerou estresse oxidativo e aumento de antioxidantes endógenos, além disso, as espécies reativas de oxigênio (ERO) inibiram a atividade da GS em 24h e 7 dias após a lesão. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que a S100B atua na lesão hemorrágica produzindo respostas distintas, região dependente, contribuindo para o aumento das células gliais no estriado e córtex, correlacionando-se positivamente com os déficits funcionais. Este é o primeiro relato descrevendo a relação da S100B com as alterações celulares e funcionais durante a progressão da HIC experimental. Além disso, os mecanismos envolvidos na HIC demonstraram padrões e respostas envolvendo excitotoxicidade glutamatérgica e inflamação, que colaboraram para o dano oxidativo; em resposta ao estresse houve o aumento de antioxidantes endógenos que podem ter contribuído para o reestabelecimento da função astrocitária.

ABSTRACT

Intracerebral haemorrhage (ICH) is a major cause of mortality worldwide, triggering adverse events and serious neurological deficits. From this standpoint, this thesis aimed to evaluate the cellular responses and interactions involved in ICH and investigate the possible mechanisms that contribute to sensory-motor deficits, mainly related to the ability of the forelimbs of animals. For this, two experiments were conducted. In both, animals of 90 days of age were subjected to ICH induced by collagenase in dorsolateral striatum. In the first experiment, after 24h, 72h and 7 days, the animals were evaluated functionally, and histologically about the lesion volume. Also, at 6h, 24h, 72h and 7 days, the striatum and the cortex was evaluated as the number of neuronal, glial and apoptotic cells; the expression of GFAP and S100B, the striatum and cortex, S100B secretion in serum and cerebrospinal fluid (CSF). ICH caused sensorimotor deficits and tissue loss; induced neuronal death and reactive gliosis in the striatum. The cortex astrocyte obtained a similar response, but about the microglia there was an increase only at 6h. S100B was positively correlated with the number of glial cells; and negatively correlated with the strength and function of the forelimbs of injured animals. In the second experiment, were evaluated the oxidative state, the level of TNF- α , the activity of glutamine synthetase (GS) and glutamate uptake at 6h, 24h, 72h and 7 days post-injury. After 6h from ICH, there was an increase in TNF- α levels and glutamatergic excitotoxicity; however, the astrocyte clearance function was established 7 days after the damage. ICH generated oxidative stress and increase of endogenous antioxidants, in addition, reactive oxygen species (ROS) inhibited the activity of GS in 24h and 7 days after injury. Based on the results obtained, we can conclude that S100B acts in hemorrhagic lesions producing different responses, region-dependent, contributing to the increase in glial cells in the striatum and cortex, correlating positively with functional deficits. This is the first report describing the relation of S100B with cellular and functional changes during the progression of experimental ICH. Furthermore, the mechanisms involved in ICH displayed patterns and responses involving glutamatergic excitotoxicity and inflammation, that contributed to oxidative damage; in response to stress there was an increase of endogenous antioxidants which may have contributed to the re-establishment of astrocyte function.

INTRODUÇÃO

1.1 HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

A hemorragia intracerebral (HIC) resulta da ruptura de vasos sanguíneos no encéfalo, sendo responsável pelo rápido acúmulo de sangue no parênquima cerebral (QURESHI; MENDELOW; HANLEY, 2009; RINCON; MAYER, 2004). Comumente, a HIC atinge os lobos cerebrais, os núcleos da base, o tálamo, o tronco encefálico (predominantemente a ponte) e o cerebelo, e é causado principalmente, por eventos decorrentes de hipertensão ou angiopatia amilóide cerebral (QURESHI et al., 2001). A maioria dos sangramentos na HIC relacionados à hipertensão arterial sistêmica promovem a ruptura espontânea de pequenas artérias ou arteríolas penetrantes a partir de micro aneurismas. Estudos indicam que a pressão arterial intraluminal aumenta persistentemente lesando as paredes dos pequenos vasos (FISHER, 1971, 1972; WOO; BRODERICK, 2002). Já a angiopatia amilóide cerebral é caracterizada pela deposição de peptídeo β amilóide e alterações degenerativas relacionadas ao envelhecimento (ROSAND et al., 2000).

A cada ano, a HIC é responsável por 2 dos 15 milhões de acidentes vasculares encefálicos (AVE) em todo mundo, representando 10 – 15% de todos os AVE (LLOYD-JONES et al., 2009; SUDLOW; WARLOW, 1997). Além disso, estima-se que 30 – 40% de todos os eventos isquêmicos encefálicos passam por algum grau de transformação para hemorragia intracerebral (THIC) (CASTILLO et al., 2002). A consequente ruptura da barreira hemato-encefálica (BHE) após a reperfusão dos vasos leva a transformação hemorrágica (TH) (HONG et al., 2014; JICKLING et al., 2014; NOUR; SCALZO; LIEBESKIND, 2012), mas o tratamento com o ativador de plasminogênio tecidual (tPA) ou cirurgia pode agravar a lesão da BHE e aumentar o risco de transformação hemorrágica. Nesse sentido, a THIC após o AVE isquêmico agudo contribui para mortalidade precoce e adversamente afeta negativamente a recuperação funcional (SUMII; LO, 2002).

A HIC é uma forma catastrófica de AVE, sendo mais devastadora que o AVE isquêmico. Causa mortalidade de 30 – 50% e a recuperação funcional é insuficiente, com apenas 20% dos sobreviventes reconquistando sua independência funcional (MAYER; RINCON, 2005; THRIFT; DONNAN; MCNEIL, 1995). Estudos clínicos e experimentais descrevem uma deterioração neurológica aguda nas primeiras horas a dias após a HIC (ROSENBERG, 2002; SUKUMARI-RAMESH; ALLEYNE; DHANDAPANI, 2012; YONG et al., 2001). De fato, a maioria das mortes após a HIC ocorrem dentro dos primeiros 2 dias após o evento (FEWEL;

THOMPSON; HOFF, 2003; HEMPHILL et al., 2001; MATSUSHITA et al., 2000), realçando a necessidade de terapias rápidas e efetivas em reduzir o dano que continua a ocorrer após a admissão do paciente ao hospital. O tratamento para a HIC ainda é limitado (MAYER; RINCON, 2005) e pouco se sabe sobre o intervalo de tempo para intervenções terapêuticas (XI; KEEP; HOFF, 2006). Por isso se faz necessário o estudo do curto intervalo de tempo das diferentes respostas do tecido neural após o AVE hemorrágico.

1.1.1. Lesões primária e secundária

O evento hemorrágico intracerebral é um processo dinâmico e complexo que envolve fases distintas. Muitas hemorragias tendem a expandir sobre várias horas após o início dos sintomas (MAYER; RINCON, 2005). A partir do insulto inicial, gera-se edema, apoptose e necrose, e acúmulo de células inflamatórias nas regiões ao redor do hematoma (QURESHI et al., 2003a) produzindo o chamado efeito de massa e/ou lesão primária. Este é caracterizado pela deformação mecânica gerada pelo hematoma, produzindo uma lesão por rompimento mecânico de neurônios e glia (QURESHI et al., 2001) causando isquemia, liberação de neurotransmissores, disfunção mitocondrial e despolarização da membrana (GRAHAM et al., 2000; LUSARDI et al., 2004; QURESHI et al., 2003a). A lesão encefálica relacionada ao efeito de massa provoca aumento de pressão intracraniana, sendo uma das causas do déficit neurológico observado após a HIC (XI et al., 1998). Além disso, é sabido que o volume do hematoma é um fator determinante para a sobrevivência após a HIC.

A lesão secundária inicia-se pelos produtos de coagulação e degradação da hemoglobina, em particular a trombina, uma protease serina produzida no encéfalo imediatamente após a HIC. A trombina ativa a microglia 4hs após o evento inicial (NAKAMURA et al., 2005, 2006; WAGNER et al., 2002; XI; KEEP; HOFF, 2006) sendo responsável pela infiltração de células inflamatórias, proliferação de células mesenquimais, formação de cicatriz, edema encefálico e convulsões (LEE et al., 1995, 1996a, 1996b, 1997a, 1997b; NISHINO et al., 1993; XI; KEEP; HOFF, 1998; XI et al., 1998). Ainda, estudos *in vitro* destacam que a trombina em altas concentrações é capaz de matar neurônios e astrócitos (JIANG et al., 2002; STRIGGOW et al., 2000; VAUGHAN et al., 1995). Em ratos, estudos prévios indicam que a trombina causa dano encefálico precoce e aumento de células apoptóticas após a HIC (HUA et al., 2002; LEE et al.,

1996a; XI; KEEP; HOFF, 1998; XI et al., 1998; XUE; DEL BIGIO, 2001). Além do importante papel da trombina na lesão hemorrágica, a microglia ativada libera produtos que induzem o rompimento da BHE, a formação de edema vasogênico, que provoca aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, e ativação da apoptose em neurônios e glia (ALVAREZ-SABÍN et al., 2004; ARONOWSKI; HALL, 2005; GONG et al., 2001; HUA et al., 2006; MATZ; LEWÉN; CHAN, 2001; YANG et al., 2006). Ao mesmo tempo, o envolvimento de células inflamatórias, como a microglia/ macrófagos, vitais para a remoção e limpeza de restos celulares do hematoma, tem a capacidade de aumentar o dano causado pela HIC (ZHAO et al., 2007). O tempo para a remoção do tecido lesado é essencial para reduzir a extensão do hematoma e os processos patológicos deletérios envolvidos na lesão secundária para, dessa forma, permitir uma recuperação mais rápida e eficiente.

Ainda, a lesão secundária após a HIC é relacionada a diferentes vias patológicas paralelas. Estas incluem citotoxicidade do sangue a partir da hidrólise da hemoglobina, hipermetabolismo e aumento do fluxo sanguíneo como resultado da excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e inflamação (ARDIZZONE et al., 2004; ARONOWSKI; HALL, 2005; GONG; HOFF; KEEP, 2000; HICKENBOTTOM et al., 1999; MUN-BRYCE et al., 2001; QURESHI et al., 2003a; ROSENBERG et al., 1990; TANG et al., 2005; WAGNER et al., 2003; WANG; DORÉ, 2007b, 2007a; XI; KEEP; HOFF, 2006; XUE; DEL BIGIO, 2000). Estas vias, somadas à expansão do hematoma, edema e morte neuronal precoce também contribuem para o déficit neurológico observado (FUJII et al., 1994; GEBEL et al., 2002; KAZUI et al., 1996; QURESHI et al., 2003a).

A lesão secundária relacionada a esses eventos deletérios inicia-se horas após a HIC (XUE; DEL BIGIO, 2001). E ao contrário da lesão primária, que ocorre rapidamente a partir do efeito de massa, a lesão secundária acontece mais lentamente desenvolvendo-se por horas a dias após o dano hemorrágico (WAGNER et al., 2003) favorecendo a deterioração do estado patológico. Assim, a lesão secundária e seus mecanismos subjacentes são alvos terapêuticos importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos. Apesar disso, pouco se sabe sobre o perfil temporal da lesão secundária após a HIC. Com base nisso, essa tese visa definir melhor algumas

das vias patológicas envolvidas no desenvolvimento da lesão secundária estudando as respostas neuronais, microgliais e astrocíticas como mediadoras nesse processo.

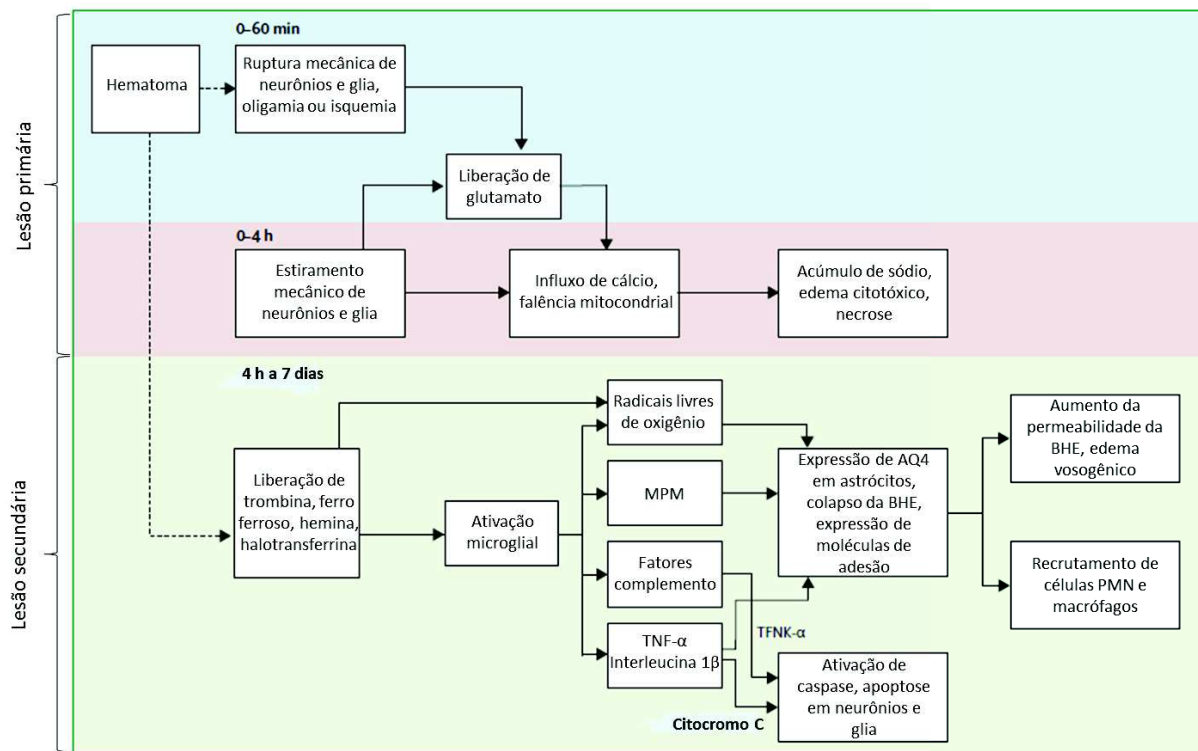


Figura 1. Sequência da lesão neural iniciada pela hemorragia intracerebral. As primeiras 4hs do evento são relacionadas com o efeito direto do hematoma e as seguintes, com a liberação dos produtos do hematoma. BHE= Barreira hemato-encefálica; MPM= Metaloproteína de matriz; TNF= Fator de necrose tumoral; PMN= Células polimorfonucleares (QURESHI; MENDELOW; HANLEY, 2009).

1.1.2. Morte neuronal

Durante a HIC, a rápida entrada de sangue no parênquima encefálico causa significativa morte celular por necrose, apoptose e autofagia (KEEP; HUA; XI, 2012). O tecido necrótico encefálico tem sido encontrado ao redor do coágulo (SUZUKI, J.; EBINA, 1980) e pode resultar de forças mecânicas durante a formação do hematoma ou de componentes do coágulo e produtos de degradação do sangue. Ao mesmo tempo, acredita-se que a consequente neurodegeneração vista após a HIC resulta da apoptose devido a fatores tóxicos difundindo-se do hematoma e da ativação de células inflamatórias que passam a se acumular horas após o início da lesão (WASSERMAN; SCHLICHTER, 2007; XUE; DEL BIGIO, 2001). Além disso, Matsushita e colaboradores (2000), trabalhando com o modelo de HIC induzida pela collagenase demonstraram o aumento de células apoptóticas no interior e ao redor da lesão hemorrágica, relacionando-as com neurônios e astrócitos (MATSUSHITA et al., 2000). Em humanos, tem

sido observado neurônios apoptóticos, especialmente na periferia do hematoma (QURESHI et al., 2003a). Entretanto, ainda que a apoptose esteja implicada na morte celular na região peri-hematoma (MATSUSHITA et al., 2000), ainda não está claro sua importância no dano encefálico induzido pela HIC.

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a morte de células neurais resulta em atrofia encefálica após a HIC (FELBERG et al., 2002; HUA et al., 2006; SKRIVER EB, 1986). A atrofia tem sido estudada como um fator predominante após a HIC (OKAUCHI et al., 2009, 2010); de fato, a atrofia encefálica é associada à lesão secundária, uma vez que sua redução, melhora dos déficits neurológicos e redução da imunorreatividade encefálica à ferritina foi observada após o tratamento com deferoxamina, um quelante de ferro. Além disso, foi evidenciado que a atrofia encefálica desenvolve-se gradualmente e tem seu pico entre 1 e 2 meses após a HIC experimental (HUA et al., 2006). Assim, a atrofia encefálica associada aos déficits neurológicos prolongados vistos após a HIC torna possível a relação desta com a morte neuronal. Consequentemente, torna-se necessária uma melhor compreensão da progressão da lesão neuronal após a lesão hemorrágica.

1.1.3. Rompimento da barreira hemato-encefálica (BHE) e edema encefálico

A BHE é um sistema especializado de células endoteliais microvasculares encefálicas que protegem o encéfalo de substâncias tóxicas circulantes, fornece nutrientes e filtra componentes danosos para o encéfalo que voltam para a corrente sanguínea. A interação próxima entre as células endoteliais microvasculares encefálicas e outros componentes da unidade como os astrócitos, pericitos, neurônios e membrana basal asseguram o correto funcionamento do SNC (PERSIDSKY et al., 2006). No entanto, o rompimento da BHE é um evento persistente que ocorre durante o desenvolvimento de várias doenças e condições patológicas do SNC como na doença de Parkinson, doença de Alzheimer, AVE, encefalopatia séptica, tumores encefálicos, isquemia permanente ou transitória seguida de reperfusão, entre outros. Provocando, dessa forma, um aumento na permeabilidade microvascular com consequente edema vasogênico (NICO; RIBATTI, 2012). Além disso, Liu e colaboradores (2012) demonstraram que a trombina também é capaz de causar o rompimento da BHE provocando edema encefálico um dia após o início da lesão. Durante o desenvolvimento da HIC, o dano induzido pela trombina é associado com a morte das células endoteliais e astrocíticas (LIU; SHARP, 2012). No

entanto, após 7 dias da HIC, inicia-se o reparo funcional da BHE manifestado pela diminuição do edema encefálico e diminuição da permeabilidade à membrana. E durante esse reparo, observa-se o nascimento de novas células endoteliais e astrócitos até a restituição completa da BHE aos 14 dias (LIU et al., 2010).

Ao mesmo tempo, o dano à barreira contribui para o edema e expansão do hematoma enquanto o fluido e os componentes sanguíneos penetram no parênquima encefálico. A formação do edema após a lesão hemorrágica eleva a pressão intracraniana e pode resultar em herniação do tecido encefálico produzindo resultados funcionais insatisfatórios e prognóstico desfavorável (BRODERICK et al., 1990; ROPPER; KING, 1984; ROPPER, 1986; ZAZULIA et al., 1999). No entanto, estudos clínicos demonstram que o edema tardio está relacionado a um pior prognóstico quando comparado ao edema visto nas primeiras horas após a HIC (GEBEL et al., 2002; ZAZULIA et al., 1999), uma vez que a formação de edema nas fases tardias está relacionada à sequência de coagulação e produção de trombina, rompimento dos eritrócitos e toxicidade dos produtos da hemoglobina. Levando em conta esses dados, se torna evidente a importância do estudo da lesão secundária após a HIC, visto que ela interfere diretamente no prognóstico e resultado funcional do paciente.

1.1.4. Inflamação

A inflamação é uma reação do organismo frente a uma infecção ou lesão tecidual, tanto central quanto periférica, podendo ser benéfica ou deletéria. Inclui a produção de mediadores que ativam, atraem, estimulam ou inibem as células provenientes do sistema imunológico. No encéfalo, muitos tipos celulares como neurônios, microglia e células endoteliais podem ser fonte ou alvo de mediadores inflamatórios. No caso da HIC, postula-se que a sinalização dependente do receptor *Toll-like 4*, tanto na microglia residente quanto nos monócitos e leucócitos infiltrantes periféricos, estão envolvidos na inflamação induzida pela HIC. A inflamação age como um importante controlador da resposta de defesa frente à lesão, iniciando imediatamente após a liberação dos componentes sanguíneos no parênquima. Acredita-se que a microglia residente e os astrócitos sejam os primeiros tipos celulares a responderem a esse insulto (ROLLAND et al., 2013; WANG; DORÉ, 2007a; WANG, 2010), envolvendo a infiltração de células inflamatórias como os leucócitos, macrófagos e células T (ARONOWSKI; HALL, 2005; GAO et al., 2008; WAGNER, 2007), seguido da liberação de várias citocinas, quimiocinas, radicais livres e outros químicos tóxicos como as

metaloproteinases (MMP's) (ARONOWSKI; HALL, 2005; GAO et al., 2008; WANG; DORÉ, 2007a; WANG; TSIRKA, 2005a) (Fig. 2).

Aproximadamente 24h após a lesão, produtos da degradação da hemoglobina provocam morte celular e liberação de mais citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) derivados, em parte, da microglia ativada (WANG; DORÉ, 2007a), direcionando a resposta inflamatória para uma nova fase. As células mortas liberam sinais que ativam os denominados padrões moleculares associados ao perigo (DAMP's – danger-associated molecular patterns) que induzem a infiltração leucocitária e assim agravam a lesão hemorrágica (KONO; ROCK, 2008). No entanto, a deterioração neurológica e a recuperação funcional insuficiente associadas à lesão secundária dependem da magnitude da resposta inflamatória após a HIC (LEIRA et al., 2004; MAIER et al., 2006; YENARI et al., 2006). Por isso se faz necessário a avaliação da resposta inflamatória, uma vez que ela pode determinar o quadro neurológico e sensório-motor observados após a HIC.

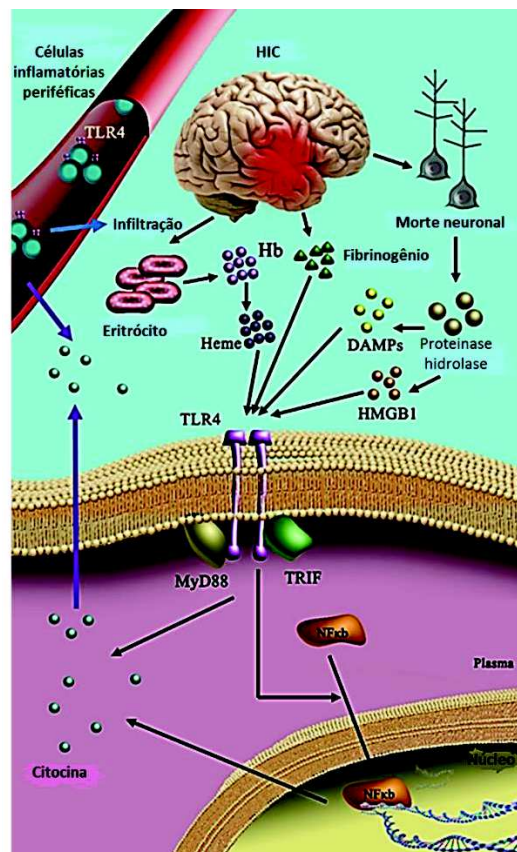


Figura 2. Inflamação induzida pela hemorragia intracerebral (ZHOU et al., 2013). Na HIC, componentes do hematoma como fibrinogênio e heme ativam o TLR4 em células macrofágicas/ microgliais e inflamatórias periféricas. Com a progressão da lesão, a morte neuronal leva à formação de DAMP's, que incluem a HMGB1, uma proteína de ligação ao DNA intracelular e outras moléculas intracelulares derivadas da degradação da matriz pelas enzimas liberadas das células mortas. O TLR4 ativado pelo heme da hemoglobina interage com duas proteínas adaptadoras distintas (MyD88 e Trif) na microglia e iniciam a ativação de fatores de transcrição que promovem a liberação de citocinas e quimiocinas após a HIC. TLR4= Receptor Toll-like 4; DAMP= Moléculas de padrão molecular associado ao dano; DNA= Ácido desoxirribonucleico; HMGB1= Proteína do grupo B1 de alta mobilidade.

1.1.5. Microglia

A microglia fornece uma linha importante de defesa contra germes invasores, trauma, isquemia, doenças neurodegenerativas ou atividades neuronais alteradas que indiquem perigo potencial ou real (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; COLTON; WILCOCK, 2010; DAVOUST et al., 2008; GRAEBER; STREIT, 2010; HANISCH; KETTENMANN, 2007; KREUTZBERG, 1996; STREIT et al., 2005; VAN ROSSUM; HANISCH, 2004). Em condições fisiológicas, elas movem seus processos em várias direções procurando por qualquer alteração para manter a integridade tecidual (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005; STENCE; WAITE; DAILEY, 2001). Quando uma lesão é detectada, entretanto, as células microgliais alteram sua morfologia, a expressão gênica e o comportamento funcional sofrendo uma mudança definida como “ativação microglial”. No caso da HIC, a liberação da hemoglobina e heme das células sanguíneas, induzem a ativação microglial via receptor *Toll-like 4* (TLR4) (SMILEY; KING; HANCOCK, 2001). A microglia ativada, no entanto, é responsável pela regulação de vários fatores de transcrição como o NF- κ B, moléculas citoplasmáticas e de superfície incluindo as classes I e II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), complemento C3 e receptor Fc que participam na defesa do organismo, trombina, receptores de limpeza (*scavenger*), pró-citocinas como o TNF- α , quimiocinas, receptores CD4 e CD8, receptores *Toll-like* e várias enzimas oxidativas como a NADPH oxidase podendo contribuir para as desordens neurais agudas e crônicas (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; HUSEMANN et al., 2002; JANDER et al., 1998; PERRY; GORDON, 1987; PERRY; NICOLL; HOLMES, 2010; RANSOHOFF; PERRY, 2009; SCHROETER et al., 1994; STREIT; WALTER; PENNELL, 1999) (Fig. 3).

Após a HIC, a limpeza do hematoma é um passo crucial para garantir um prognóstico positivo e a melhora funcional. A microglia ativada e outros macrófagos provenientes do sangue que entram no sítio da lesão são responsáveis por essa limpeza. Dentro de horas após o dano, a microglia ativada engolfa os componentes do hematoma liberando grandes quantidades de produtos pró-oxidantes e citocinas inflamatórias que promovem lesão neuronal e morte celular (HANISCH; KETTENMANN, 2007; SPLETTSTOESSER; SCHUFF-WERNER, 2002; WOO et al., 2012; ZHAO et al., 2007). No entanto, a infiltração dos macrófagos derivados do sangue só iniciam 5 dias após a HIC (MACKENZIE; CLAYTON, 1999; SCHILLING et al., 2003). Fatos que também são esperados em pacientes com HIC (ZHOU et al., 2013).

Ao mesmo tempo que a ativação microglial excessiva e precoce pode provocar a piora da HIC, se iniciada tardiamente, pode exercer um papel neuroprotetor fornecendo um ambiente propício para a recuperação tecidual (STREIT, 2002). Por isso, a inibição completa da microglia também pode ser desastrosa, uma vez que sua função mais importante após a HIC é remover o hematoma. Para determinar o tempo de resolução do hematoma e correlacioná-lo à ação da microglia, diversos estudos foram feitos. Em modelos animais de HIC induzido pela colagenase demonstrou-se que o volume do hematoma pode permanecer inalterado nos primeiros 3 a 7 dias, mas é removido quase completamente, do dia 7 ao 14 após o dano encefálico (WANG; KLIONSKY, 2003; WANG; TSIRKA, 2005b). Consequentemente, podemos sugerir que o papel da microglia ativada é dependente do tempo e do tamanho do hematoma seguindo paralelamente a sua resolução (WANG; DORÉ, 2007a), contribuindo, dessa forma, para o processo de reparo da lesão hemorrágica.

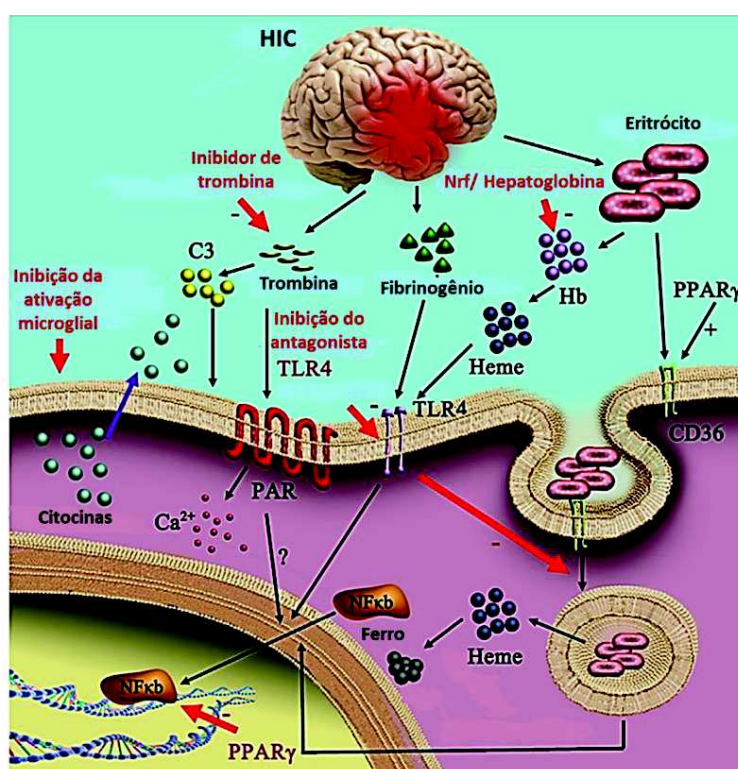


Figura 3. Vias de sinalização que ativam a microglia após a hemorragia intracerebral (ZHOU et al., 2013).

1.2. INTERAÇÃO ENTRE MICROGLIA E ASTRÓCITO

Os astrócitos são as células gliais predominantes encontradas no SNC desempenhando importante papel na homeostasia encefálica, incluindo a formação e manutenção da BHE, regulação do fluxo sanguíneo cerebral, manutenção da homeostasia iônica e secreção de fatores neuroprotetores (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009). Tem sido evidenciado que os astrócitos têm potencial antioxidativo mais potente que os neurônios (LUCIUS; SIEVERS, 1996), tornando estes mais resistentes ao estresse oxidativo (SWANSON; YING; KAUPPINEN, 2004; TANAKA et al., 1999). Durante a lesão encefálica, os astrócitos podem modular a sobrevivência neuronal produzindo fatores angiogênicos e neurotróficos (DHANDAPANI; MAHESH; BRANN, 2003; SWANSON; YING; KAUPPINEN, 2004) e indiretamente afetar a lesão neuronal a partir da modulação da inflamação, diminuindo a expressão de mediadores inflamatórios microgliais (ALOISI et al., 1997; PYO et al., 2003). Min e colaboradores (2006) revelam que os astrócitos podem cooperar com a microglia prevenindo respostas inflamatórias no encéfalo regulando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MIN et al., 2006). Portanto, a modulação da ativação microglial através dos astrócitos pode ser um novo método para minimizar a HIC e um alvo interessante de estudo.

1.3. O PAPEL DO ASTRÓCITO NA INFLAMAÇÃO E MORTE NEURONAL

As respostas inflamatórias seguidas da hemorragia encefálica agravam a lesão encefálica provocando dano tecidual e morte celular encefálica maciça (WANG; DORÉ, 2007a; XI; KEEP; HOFF, 2006; YENARI et al., 2006). Neutrófilos, macrófagos e microglia ativada acumulam ao redor do hematoma (DEL BIGLIO et al., 1996) podendo contribuir para a morte neuronal que ocorre nessa região nas primeiras horas e dias após a HIC. A liberação de citocinas inflamatórias como o TNF- α , quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, metaloproteases de matriz e óxido nítrico têm sido implicadas na morte neuronal (BARONE; FEUERSTEIN, 1999; CHAN, 2001; CUNNINGHAM; WETZEL; ROSENBERG, 2005; JIAN LIU; ROSENBERG, 2005). A redução da morte celular e a melhora comportamental já foram evidenciados após a HIC e tratamentos com imunossupressores e inibidores do TNF- α (MAYNE et al., 2001a, 2001b; PEELING et al., 2001). Contudo, não está claro se a morte celular ocorre como resultado

da inflamação ou se uma resposta inflamatória reduzida causaria uma diminuição da morte celular. Por outro lado, evidências demonstram que a perda da função dos astrócitos, e não a inflamação, possa ser a causa da lesão encefálica secundária e, portanto, da morte neuronal.

Em estados de lesão, os astrócitos rapidamente produzem moléculas anti-inflamatórias (KIM et al., 2010) agindo de forma inibitória na resposta microglial à lesão, sendo crucial, dessa forma, para a prevenção da morte neuronal e, portanto, da lesão encefálica. A perda de função e/ou morte de astrócitos já foi observada após a lesão medular experimental, sendo precedida por morte neuronal secundária (MIN et al., 2012). Além disso, astrócitos estimulados pela lesão produzem citocinas, incluindo TNF- α , interleucinas e interferons, que por outro lado, estimulam sequências apoptóticas. A deleção de aquaporina 4 (AQP4), o principal canal de água no encéfalo fortemente expresso em membranas plasmáticas de astrócitos estão relacionadas com a expressão excessiva de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α , produzindo piora neurológica e aumento de morte neuronal por apoptose após a HIC. Dessa forma, podemos pressupor que a morte neuronal após a HIC pode estar intimamente relacionada às funções astrocitárias, seja por um suporte insuficiente ou por meio de sua ativação, liberando substâncias pró-inflamatórias (CHU et al., 2014; JEONG et al., 2013).

1.3.1. O duplo papel dos astrócitos

Os astrócitos são as células não neuronais mais numerosas do SNC e são responsáveis por cerca de 50% do volume encefálico humano (TOWER AND YOUNG, 1973). Possuem diversas funções essenciais para o ótimo funcionamento do SNC, incluindo a captação e liberação de glutamato, tamponamento do potássio e do hidrogênio e transporte de água, podendo influenciar no crescimento de neuritos, na sobrevivência neuronal após diversos insultos e em outros processos que contribuem para a recuperação encefálica no período pós-lesão. No entanto, certas funções astrocitárias podem ter consequências patológicas após o AVE, como por exemplo, a participação em processos inflamatórios e produção de substâncias potencialmente neurotóxicas como a S100B, que podem aumentar o volume de lesão após o AVE (CHEN; SWANSON, 2003; EROGLU, 2009; GIFFARD; SWANSON, 2005; SOFRONIEW, 2005; TRENDELENBURG; DIRNAGL, 2005). Pode também contribuir para a morte neuronal tardia a partir da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (ENDO et al., 1993). O óxido nítrico é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) que pode potencializar a excitotoxicidade

glutamatérgica e contribuir para a morte neuronal (HEWETT; CSERNANSKY; CHOI, 1994) e o aumento do tamanho do infarto.

A função dos astrócitos é regulada por várias proteínas de canais, mantendo o fluxo de água e íons através da membrana celular. Esses canais são importantes para a fisiologia normal de muitos tipos celulares e defeitos na sua função podem gerar sérias consequências (HINSON et al., 2012; LENNON et al., 2004; WATERS; VINCENT, 2008). A deleção da aquaporina 4 (AQP4), por exemplo, importante no controle extracelular de água e no tamponamento de K^+ , causa morte neuronal e glial por apoptose após a HIC (CHU et al., 2014). A redução do canal de K^+ retificador de entrada (Kir4.1), também envolvido no tamponamento de K^+ , leva a um aumento extracelular de K^+ e glutamato, contribuindo para a excitabilidade encefálica e epileptogênese (NOEBELS et al., 2010). A disfunção desses canais, dessa forma, leva ao comprometimento da homeostase de água e solutos, à hiperexcitabilidade neuronal a partir do aumento de K^+ e glutamato extracelular podendo contribuir para muitas desordens neurológicas e doenças neurodegenerativas (ILIFF et al., 2012). Portanto, a função ou disfunção dos astrócitos dentro da unidade neurovascular pode ter amplas implicações para a saúde e para as desordens do SNC.

1.3.2. Astrocitose reativa

Astrocitose reativa é uma combinação de alterações moleculares, celulares e funcionais em astrócitos que ocorrem em resposta a lesões do SNC que abrange desde hipertrofia celular até proliferação e formação de cicatriz, culminando com o aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (SOFRONIEW; VINTERS, 2010; SOFRONIEW, 2009).

Diversos estímulos podem disparar a ativação astrocitária no encéfalo de roedores, como por exemplo, o fator de crescimento transformante alfa ($TGF-\alpha$), o fator inibitório da leucemia (LIF), oncostatina M e $TNF-\alpha$ (BALASINGAM et al., 1994; HOSTENBACH et al., 2014; KLEIN et al., 1997; RABCHEVSKY et al., 1998; SOFRONIEW, 2009; SRIRAM et al., 2004; WINTER et al., 1995). Tais mediadores moleculares podem ser liberados por qualquer tipo celular do SNC, incluindo neurônios, astrócitos, microglia, oligodendrócitos, pericitos e endotélio em resposta a todas as formas de insulto do SNC (SOFRONIEW, 2009). O efeito da ativação astrocitária mediada por fatores de crescimento e citocinas como a interleucina 6 (IL6), fator inibidor da leucemia (LIF) e $TNF-\alpha$, assim como neurotransmissores como o glutamato e

espécies reativas de oxigênio (ERO) está relacionado a diferentes aspectos e graus de astrogliose reativa como o aumento da expressão de GFAP, hipertrofia celular, proliferação e efeitos pró ou anti-inflamatórios (SOFRONIEW, 2009). A liberação de fatores tóxicos como a S100B, óxido nítrico induzível ou a participação em processos inflamatórios em cooperação com a microglia podem contribuir para o crescimento do AVE (ASANO et al., 2005). As alterações sofridas pelos astrócitos reativos variam com a natureza e severidade do insulto ao longo de contínuas e progressivas alterações na expressão molecular, hipertrofia celular progressiva e, em casos severos, proliferação e formação de cicatriz glial. As alterações da astrogliose são reguladas de forma específica ao contexto por eventos sinalizadores que têm potencial para modificar a natureza e o grau dessas alterações. Esses eventos, no entanto, podem gerar benefícios ou prejuízos nas células circundantes à lesão (SOFRONIEW, 2009). Portanto, uma melhor compreensão dos mediadores moleculares responsáveis pela ativação da astrocitose reativa podem facilitar o direcionamento de novas estratégias terapêuticas que atenuem os aspectos prejudiciais desse processo.

1.4. O PAPEL DA PROTEÍNA S100B NA PATOFISIOLOGIA DA HIC

A proteína S100B é membro de uma família multigênica de proteínas ligantes de cálcio implicada na regulação da homeostasia do cálcio (XIONG et al., 2000), controle da estabilidade dos microtúbulos (SORCI; AGNELETTI; DONATO, 2000) e modulação da mitose (DONATO, 2003).

A S100B pode ser passivamente liberada de células lesadas e/ou necróticas, podendo ser observada no fluido cérebro-espinhal (LCE), soro e fluido amniótico em níveis elevados, sendo muito utilizado para propósito de diagnóstico/prognóstico (SEN; BELLI, 2007). No encéfalo, a principal fonte da proteína S100B tem sido detectada nos astrócitos e oligodendrócitos assim como em algumas subpopulações neuronais (DONATO, 1999; SCHÄFER; HEIZMANN, 1996; ZIMMER et al., 1995).

A S100B possui efeitos dose-dependentes em neurônios e astrócitos, estimulando o crescimento de neuritos (KLIEMAN; MARSHAK, 1985) e proliferação astrocitária (SELINFREUND et al., 1991) em concentrações nano molares (nM), por outro lado, pode causar morte celular em concentrações mili molares (mM) (HU; FERREIRA; VAN ELDIK,

1997; HU et al., 1996; MARIGGIÓ et al., 1994). Pouco se sabe sobre o mecanismo de liberação da S100B, entretanto, postula-se que ocorra através da ligação do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE - Receptor for advanced glycation endproducts) ativando o fator de transcrição NF- κ B. A RAGE é um receptor de padrão de reconhecimento envolvido na ativação da imunidade inata e a S100B têm demonstrado interagir com esse receptor em células microgлияis, astrocitárias e neuronais (HOFMANN et al., 1999; HUTTUNEN et al., 2000; VILLARREAL et al., 2011) causando apoptose via ativação excessiva da cinase extracelular regulada pelo sinal (extracelular signal-regulated kinase – (ERK) 1/2) e superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HUTTUNEN et al., 2000). Ainda, altas doses de S100B podem estimular a óxido nítrico sintase (iNOS) (ADAMI et al., 2001; HU et al., 1996; PETROVA; HU; VAN ELDIK, 2000) em astrócitos e microglia podendo contribuir para a apoptose neuronal e astrocitária pelo aumento da produção de óxido nítrico (HU; FERREIRA; VAN ELDIK, 1997). No entanto, os efeitos da S100B durante a progressão da HIC experimental ainda são desconhecidos.

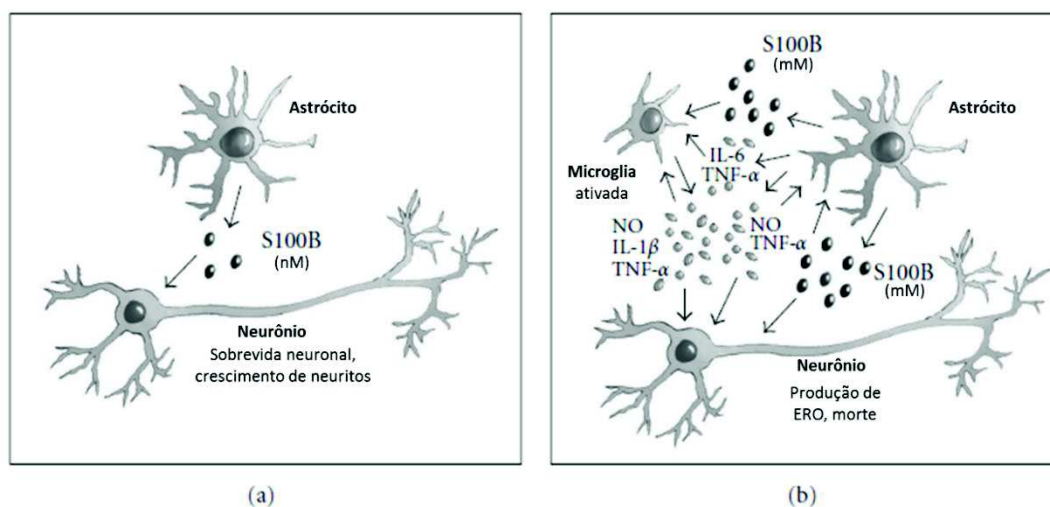


Figura 4. Representação esquemática dos efeitos extracelulares da S100B no encéfalo. (a) Em concentrações baixas, a S100B promove a sobrevivência neuronal e estimula o crescimento de neuritos via sinalização da RAGE. (b) Em altas concentrações, a S100B causa morte neuronal via estimulação excessiva da sinalização da RAGE em neurônios e indiretamente via ativação dependente da RAGE na microglia e astrócitos. IL-6= Interleucina 6; TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa; NO= Óxido nítrico; IL-1 β = Interleucina 1 β ; ERO= Espécies reativas de oxigênio (SORCI et al., 2010).

1.5. ESTRESSE OXIDATIVO NA HIC

O estresse oxidativo tem um papel proeminente na patogênese da HIC (ARONOWSKI; ZHAO, 2011). Evidências experimentais sugerem que a toxicidade da hemoglobina e o estresse oxidativo mediado pelos produtos de degradação da hemoglobina contribuem para a lesão secundária (CHEN-ROETLING; LU; RF, 2015; LETARTE et al., 1993). O rompimento dessas células inicia-se 24h após a lesão e continua por aproximadamente 7 dias, sendo um dos fatores responsáveis pela deterioração do quadro neurológico (WAGNER et al., 2003). A hêmina, a forma oxidada do heme da hemoglobina, acumula nos hematomas intracraniais gerando citotoxicidade (CHEN-ROETLING; LU; RF, 2015). O ferro, outro produto de degradação da hemoglobina, também contribui para a formação de radicais livres e para a peroxidação lipídica após a HIC (KOEPPEN; DICKSON; SMITH, 2004; SIESJO; AGARDH; BENGTSSON, 1989; WAGNER et al., 2003; WU et al., 2002, 2003).

Níveis elevados de radicais livres podem causar lesão em todos os componentes celulares, incluindo DNA, lipídeos e proteínas, provocando danos em neurônios, células gliais, vasos sanguíneos e fibras nervosas (JI; SANG; SEUNG, 2005). Entretanto, o tecido encefálico possui uma grande quantidade de defesas endógenas contra a lesão encefálica que incluem: glutathione, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (HAZELL, 2007; YOUNG; WOODSIDE, 2001). Porém, durante o processo de lesão, essas defesas antioxidantes naturais podem ser rapidamente sobrecarregadas após o comprometimento energético, levando a um aumento na produção de radicais superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (WARNER; SHENG; BATINIĆ-HABERLE, 2004). O desenvolvimento de estresse oxidativo pode acarretar distúrbios na função cerebral, incluindo inibição do transporte de glutamato devido a nitrosilação da proteína transportadora pela formação de peroxinitrito (AGOSTINHO; DUARTE; OLIVEIRA, 1997; TROTTI; DANBOLT; VOLTERRA, 1998; TROTTI et al., 1996; VOLTERRA et al., 1994). Assim, se faz necessário um estudo mais abrangente do estado redox encefálico após a HIC, uma vez que a literatura descreve uma importante contribuição dos radicais livres na patofisiologia do AVE.

1.5.1. O papel dos astrócitos no estresse oxidativo

O estresse oxidativo possui um papel pronunciado na HIC, uma vez que a sobrecarga de ferro no encéfalo pode causar a formação de radicais livres e dano oxidativo. Os astrócitos contêm grande concentração de glutatona e enzimas envolvidas no seu metabolismo em comparação com os neurônios (MAKAR et al., 1994; SLIVKA; MYTILINEOU; COHEN, 1987; WILSON, 1997; YUDKOFF et al., 1990). A glutatona é o principal antioxidante no encéfalo e a sua depleção resulta em um encéfalo mais vulnerável, podendo induzir neurotoxicidade glutamatérgica a partir do prejuízo dos transportadores de glutamato e aumentar o estresse oxidativo (LEE et al., 2010; TROTTI; DANBOLT; VOLTERRA, 1998; VOLTERRA et al., 1994). Além disso, o fluxo de glicose através da via das pentoses aumenta três vezes nos astrócitos em relação aos neurônios durante a exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BEN-YOSEPH; BOXER; ROSS, 1996), sugerindo que os astrócitos possuem grande capacidade de eliminar as espécies reativas de oxigênio (ERO) e dessa maneira, influenciar na sobrevivência neuronal. Em suporte a esses achados, diversos estudos utilizando meio de cultura observaram que neurônios, na presença de astrócitos, são mais resistentes à lesão induzida por óxido nítrico, peróxido de hidrogênio ou superóxido em comparação com neurônios sozinhos (DESAGHER; GLOWINSKI; PREMONT, 1996; LUCIUS; SIEVERS, 1996; TANAKA et al., 1999; XU; LEE; GIFFARD, 1999). Em contrapartida, estudos evidenciam que astrócitos adultos são vulneráveis à estímulos oxidativos, alterando a permeabilidade da membrana e a atividade mitocondrial, além de reduzir a captação de glutamato e atividade da glutamina sintetase (GS) após lesão induzida por H_2O_2 (LEWIS et al., 2012; PERTUSA et al., 2007; SWANSON et al., 1997; YANG et al., 2011). Isto reforça a importância da ação astrocitária para a sobrevivência neuronal e para a resolução de desordens do SNC como a HIC.

1.6. EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA APÓS A HIC

Altos níveis de trombina são produzidos após a HIC e podem contribuir para a morte neuronal (XI; REISER; KEEP, 2003). Ramos-Mandujano e colaboradores descrevem que a

trombina aumenta significativamente o glutamato extracelular mediado pelo edema em cultura de astrócitos expostos a um meio hiposmótico (RAMOS-MANDUJANO et al., 2007). Em um estudo experimental, Lee e colaboradores descrevem que o glutamato acumula durante o período inicial do hematoma (LEE et al., 2006). Entretanto, ainda não se tem claro as consequências do aumento de glutamato extracelular na patofisiologia da hemorragia intracerebral. Portanto, o estudo da captação de glutamato se faz necessário, uma vez que o aumento da concentração de glutamato no meio extracelular pode levar a efeitos desastrosos para as células do SNC. Além disso, estudos tem observado uma relação entre níveis de glutamato e lesão secundária na região peri-hematoma em modelos animais de HIC, bem como o impacto desse neurotransmissor na sobrevivência de pacientes com HIC (CHIANG et al., 2006; HARTINGS et al., 2008; MILLER et al., 2007; QURESHI et al., 2003a; WANG; GARDINER; FERNYHOUGH, 2008).

1.7. MODELOS ANIMAIS DE HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

Modelos animais de HIC têm sido desenvolvidos utilizando-se porcos, coelhos, cachorros, gatos e roedores. O sangramento é normalmente induzido no estriado, mas outras regiões têm sido estudadas (MACLELLAN et al., 2010). Dois modelos animais são frequentemente utilizados para simular o quadro de HIC humana: a injeção intracerebral de colagenase (MESTRINER et al., 2011) ou de sangue autólogo (MACLELLAN et al., 2008). A colagenase é uma metaloproteinase derivada da bactéria *clostridium histoliticum* que, quando injetada no encéfalo, rompe a lâmina basal dos vasos sanguíneos cerebrais permitindo a entrada de sangue para dentro do parênquima (ROSENBERG et al., 1990). No intuito de limitar o número de vasos sanguíneos afetados e assim controlar o tamanho do sangramento, muitos experimentadores injetam colagenase num volume pequeno de solução salina (~ 0,5 µl) (MASUDA et al., 2010; WASSERMAN; ZHU; SCHLICHTER, 2007). Esse modelo é realístico, uma vez que o hematoma desenvolve-se após a ruptura dos vasos sanguíneos cerebrais provocando aumento da pressão intracraniana, no entanto, ele não mimetiza precisamente a ruptura de um único vaso, normalmente observada em humanos. No modelo de sangue autólogo, uma grande quantidade de sangue (~ 100 µl) é injetada diretamente no encéfalo. Esse modelo visa mimetizar um único evento que acredita-se ocorrer na maioria das HIC em humanos. Entretanto, na maioria dos pacientes o sangramento continua por horas após

o insulto (WARTENBERG; MAYER, 2007). Portanto, o modelo de sangue autólogo não é apropriado para investigar a progressão da lesão hemorrágica, uma vez que a injeção de sangue autólogo tende a ter uma resolução mais rápida e efeitos mais brandos do que o modelo de colagenase (MACLELLAN et al., 2010).

Em um estudo comparando os dois modelos de HIC, MacLellan e colaboradores (2008) mostraram que apesar das claras limitações, o modelo da colagenase resultou em um maior colapso da BHE e dano ao estriado, substância nigra, substância branca e córtex em relação ao modelo de sangue autólogo. Além disso, o modelo de sangue autólogo demonstrou uma menor perda de tecido entre 1 a 6 semanas, em comparação com o modelo da colagenase. Entretanto, o tecido perdido continuou a aumentar durante 4 semanas no modelo de colagenase e, portanto, produziu déficits funcionais maiores e que se mantiveram até a 4ª semana (MACLELLAN et al., 2008). De acordo com esses achados, o modelo de colagenase é mais útil para estudar a progressão da lesão encefálica como a morte celular ou dano à BHE ao redor do hematoma. Conseqüentemente, o modelo de colagenase se aproxima mais da HIC vista em humanos, pois os pacientes muitas vezes permanecem com graves déficits ao longo da vida. É importante ressaltar que a colagenase não é tóxica para os neurônios, não influenciando nas alterações decorrentes da lesão secundária após a HIC.

Uma vez que o foco desta tese é entender o perfil temporal das respostas celulares relacionadas à lesão secundária ao redor do hematoma, o modelo de colagenase foi escolhido pelo entendimento de que ele fornece resultados mais consistentes e próximos à realidade.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta tese é avaliar o perfil temporal das respostas funcionais, histológicas, neurais e inflamatória no modelo de hemorragia intracerebral experimental induzida por collagenase em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, nos intervalos de 24h, 72h e 7 dias após a hemorragia intracerebral:

I. O perfil da recuperação sensório-motora utilizando escore neurológico, teste de preensão e o teste do cilindro; e o volume de lesão através de técnicas estereológicas específicas.

- Avaliar, nos intervalos de 6h, 24h, 72h e 7 dias após a hemorragia intracerebral:

II. O conteúdo proteico de S100B (soro, LCE, estriado e córtex) e GFAP (estriado e córtex).

III. A porcentagem de células neuronais, apoptóticas (estriado) e gliais (estriado e córtex).

IV. O estado redox através da quantificação das espécies reativas de oxigênio (DCF), da lipoperoxidação (TBARS); do tripeptídeo glutathiona (GSH); e das proteínas anti-oxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) (estriado).

V. Os níveis da citocina inflamatória TNF- α (estriado).

VI. A atividade da glutamina sintetase (GS) (estriado).

VII. O glutamato extracelular através da captação de glutamato (estriado).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Todos os procedimentos e desenho experimental (Fig. 5) foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (número 23976), e estão de acordo com as Orientações para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório adotados pelo Instituto Nacional de Saúde (EUA) e com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Ratos *Wistar* machos adultos (n = 101) foram obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS com 3 meses de idade (300–350 g) e alojados em grupos de 4–5 em gaiolas de Plexiglas em condições padrões de laboratório (ciclo de 12hs claro/escuro com luzes apagadas às 7:30 e temperatura controlada em 22±2 °C). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Os animais experimentais foram divididos em 5 grupos dependendo do seu tempo de eutanásia (Controle naïve, 6h, 24h, 72h e 7 dias pós-HIC). Entretanto, para as avaliações funcionais e análise histológica, os animais foram avaliados nos tempos de 24h, 72h e 7 dias pós-lesão. Para isso, foram utilizados animais sham controles ao invés de naïve para comprovar a ausência de lesão nos animais injetados com salina. Para as avaliações funcionais, os animais foram submetidos ao teste do cilindro, score neurológico e teste de preensão por um investigador que não tinha conhecimento sobre os diferentes grupos experimentais. Para as investigações bioquímicas, descritas abaixo, foram quantificados a expressão de GFAP e S100B por ELISA, assim como as células marcadas com GFAP, S100B, CD11b (estriado e córtex sensorio-motor), MAP2 e caspase-3 (estriado) por citometria de fluxo para avaliar astrócito, microglia, neurônio e morte celular por apoptose, respectivamente. Em um segundo momento, foram analisados o estado oxidativo através da medida de DCF e níveis de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes como a SOD, GPx e CAT e conteúdo da GSH. Além disso, foram determinadas a atividade da GS e a captação de glutamato como medidas indiretas da função astrocitária. Ainda, foi realizada a análise do TNF- α no estriado para comprovar a resposta inflamatória e, portanto, a efetividade da lesão. Entretanto, por se tratar de uma citocina de rápida resposta, essa análise foi realizada apenas nos tempos de 6 e 24hs pós-HIC.

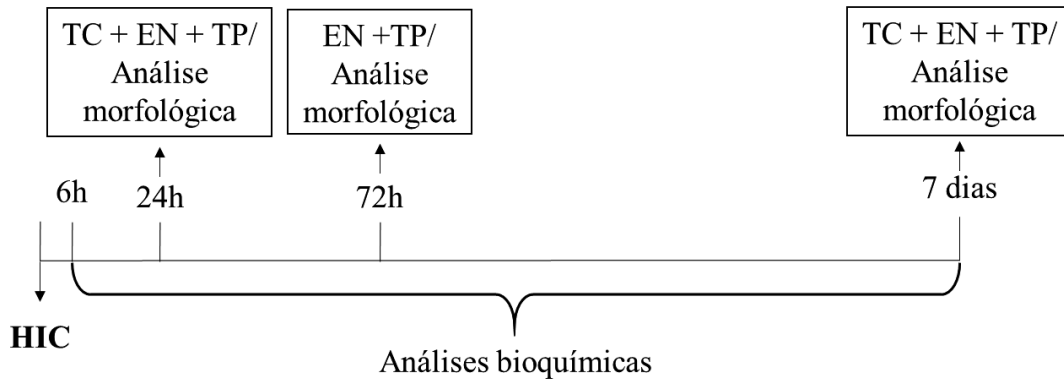


Figura 5. Desenho experimental. TC = teste do cilindro; EN = escore neurológico; TP = teste de preensão.

3.1.1. Hemorragia Intracerebral

Para a cirurgia de HIC, como previamente realizado em nosso laboratório (MESTRINER et al., 2011, 2013), os animais foram anestesiados com 4% de halotano em 30% de oxigênio e 70% de óxido nitroso e mantidos em um aparato esteretáxico com halotano a 2%. Uma incisão na linha média foi realizada no escalpo (entre as marcações do Bregma e Lambda) e um orifício de trepanação foi então perfurado no crânio 3.6 mm lateral ao Bregma no lado esquerdo. Então, uma agulha de calibre 26 (Hamilton, Reno, NV, USA) foi inserida 6.0 mm profundamente na abertura e 0.2 U de colagenase bacteriana tipo IVs (Sigma-Aldrich, USA) diluída em 1.0 µL de salina foi infundida no estriado (MACLELLAN; GYAWALI; COLBOURNE, 2006; MACLELLAN et al., 2008; ROSENBERG et al., 1990; SZYMANSKA et al., 2006) durante 5 minutos. A agulha foi mantida na mesma posição por 5 minutos adicionais e em seguida, lentamente removida para prevenir o refluxo da substância (SZYMANSKA et al., 2006). Nos animais sham, a colagenase foi substituída por salina estéril. A temperatura corporal dos animais foi mantida entre 36.5 °C e 37.5 °C durante toda a cirurgia utilizando um cobertor de aquecimento auto regulável (Letica, Spain). Nesse estudo, 10% dos animais morreram devido a complicações da cirurgia/ lesão.

3.2. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Todas as avaliações comportamentais foram realizadas nos tempos de 24h, 72h e 7 dias pós-HIC.

3.2.1 Escore Neurológico

Para o escore neurológico, os animais foram avaliados quanto a rotação ipsilateral espontânea e habilidade de locomoção na viga de madeira para avaliar a disfunção motora geral. A observação da rotação ipsilateral espontânea foi avaliada com o animal sendo erguido pela cauda durante 10 segundos, sendo graduado de 0 (sem rotação) a 4 (rotação contínua). O teste de habilidade de locomoção na trave, que envolveu uma viga de madeira e uma caixa escura no final da escada horizontal, foi repetida três vezes para adaptar os animais e a sessão de teste foi realizada apenas uma vez (ALTUMBABIC; PEELING; DEL BIGIO, 1998; IMAMURA et al., 2003) para observação da locomoção. A habilidade de locomoção na trave foi graduada 0 quando o animal atravessava a viga de madeira sem qualquer dificuldade, e 4 quando o animal não conseguia se manter na viga por pelo menos 10 segundos. O escore dos dois testes foram somados para gerar uma pontuação geral do déficit motor.

3.2.2 Teste de Preensão

Para o teste de preensão dos membros anteriores, os animais foram erguidos pela cauda e segurados cerca de 10-15 cm de distância a partir e acima da barra de aço como previamente descrito (JEYASINGHAM et al., 2001). O animal foi então, rebaixado pela cauda em direção à haste de aço até ele agarrar a barra. Neste ponto, a cauda é baixada até que o corpo esteja horizontal e o animal é puxado para fora a partir da haste com uma tração leve e constante até ele soltar a barra. O medidor de tensão permanecerá fixo na sua deflexão máxima, que é a força necessária para romper a preensão do animal. O teste foi repetido 3 vezes em uma sessão, sem contar aqueles em que o animal se segura apenas com uma pata ou sacode a haste. Uma média

das 3 leituras admissíveis foi registrada como a pontuação da força máxima de apreensão (CABE et al., 1978).

3.2.3 Teste do cilindro

Os animais foram colocados em um cilindro de acrílico (20 cm diâmetro × 40 cm altura) situados sobre uma mesa de vidro e filmados de baixo através de um espelho inclinado. Os contatos espontâneos dos membros anteriores ipsi e contralaterais na parede do cilindro foram filmados durante 2 min. Os animais que fizeram menos de 12 contatos independentes na parede foram excluídos (MACLELLAN; GYAWALI; COLBOURNE, 2006; SCHALLERT, 2006), totalizando 3 ratos. Para obtenção do resultado final, a média de contatos do membro anterior contralateral à lesão (direita) foi dividida pela soma dos contatos dos membros anteriores direito e esquerdo, multiplicado por 100.

3.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Após 24h, 72h e 7 dias da HIC, os animais foram profundamente anestesiados com xilazina (10 mg/Kg) e tiopental sódico (50mg/Kg; Cristália, Brasil) e injetados com 1000 IU de heparina (Cristália, Brasil). Em seguida foram perfundidos através do ventrículo esquerdo utilizando uma bomba peristáltica (Companhia Controle, São Paulo, Brasil) com 100 mL de solução salina seguida de 200 mL de solução fixadora composta por 4% de paraformaldeído (PFA) (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) em 0.1 M de tampão fosfato (TF) pH 7.4 à temperatura ambiente. Os cérebros foram pós-fixados em PFA a temperatura ambiente por 4hs, mantidos em sacarose 30% por 3 dias e então, congelados em isopentano e nitrogênio líquido. Secções coronais (20 µm) foram obtidas utilizando criostato (Leica, Germany). Uma de cada 10 secções (200 µm) foi utilizada para a análise histológica, iniciando a +1,7 mm do Bregma e finalizando a -4,8 mm (MACLELLAN; GYAWALI; COLBOURNE, 2006; PAXINOS; WATSON, 2007). Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e o volume da lesão foi estimado utilizando o software Scion Image J 4.0 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) como previamente descrito (MACLELLAN; COLBOURNE, 2005; MESTRINER et al., 2011, 2013).

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após 6h, 24h, 72h e 7 dias da HIC, os animais foram decapitados com o auxílio de uma guilhotina. Os encéfalos foram removidos e dissecados para a retirada do estriado e do córtex sensorio-motor para a análise bioquímica abaixo descrita.

3.4.1 Análise por citometria de fluxo

Estriado e córtex sensorio-motor foram dissociados com PBS/colagenase e as células foram permeabilizadas com 0,1% PBS Triton X-100 por 10 min a temperatura ambiente e bloqueadas por 15 min com 3% de soro normal de cabra (Sigma Aldrich - G9023). Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos primários contra neurônios (anti-MAP2 rabbit - Sigma Aldrich - M9942), astrócitos (anti-GFAP rabbit - Sigma Aldrich - G9269), células positivas S100B (anti-S100B mouse - Sigma Aldrich - S2532), macrófago/microglia (anti-CD11b mouse Millipore - CBL1512) e células apoptóticas (anti-caspase-3 rabbit Cell signaling - 9661), em concentração final de 1:100 em temperatura ambiente por 2 h. As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 1 h com anticorpo IgG Alexa-fluor 633 anti-rabbit e Alexa-fluor 488 anti-mouse, em concentração final de 1:200. Os controles negativos (amostras com os anticorpos secundários) foram incluídos para calibrar a voltagem da máquina e para determinar a região negativa do histograma (*dot plot*). A emissão dos fluoró cromos foi registrada através de filtros banda específicos: verde (FL-1; 530 nm/30) e vermelho (FL-4; 670 nm long pass). As emissões fluorescentes foram coletadas utilizando-se amplificadores logarítmicos. Brevemente, os dados de 10.000 eventos (células intactas) foram adquiridos e o número de células foi determinado após a exclusão dos eventos de debris a partir do conjunto de dados. O número de células em cada quadrante foi computado e a proporção das células marcadas com GFAP, MAP2, CD11b, S100B e caspase 3, separadamente, foram expressas como porcentagem de células marcadas positivas (HEIMFARTH et al., 2012). Todas as aquisições citométricas de fluxo e análises foram realizadas utilizando os softwares FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e Flow Jo (WEIS et al., 2012).

3.4.2 Quantificação da proteína

A proteína foi mensurada pelo método de Lowry, modificado por Peterson, utilizando soro de albumina bovina como padrão (PETERSON, 1977).

3.4.3 Tecido encefálico e amostras de soro e líquido cérebro-espinhal (LCE)

Os animais foram anestesiados via i.p com xilazina (10 mg/Kg) e tiopental sódico (50mg/Kg; Cristália, Brasil) e posicionados em um aparato estereotáxico, então, o líquido cérebro espinhal foi obtido por punção da cisterna magna utilizando uma seringa de insulina. Um volume máximo de 30 μ L foi coletado durante um período de 3 minutos para reduzir o risco de dano ao tronco encefálico. Para as amostras de soro, foram retirados aproximadamente 1mL de sangue via punção cardíaca. A seguir, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante retirado. As amostras de LCE e soro foram congeladas (-70 °C) até serem utilizadas para a determinação do imunoc conteúdo de S100B. Os animais foram, então decapitados e os encéfalos removidos, córtex e estriado foram dissecados no gelo e fatias transversais de 0,3 mm foram obtidos utilizando o Chopper de tecido Mcillwain (VIZUETE et al., 2013).

3.4.4 Quantificação da S100B

As fatias foram homogeneizadas em PBS (50 mM NaCl, 18 mM Na₂HPO₄, 83 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4), contendo 1 mM de EGTA e 1 mM de fluoreto de fenimetil-sulfonilo (PMSF). O conteúdo de S100B no soro, LCE e tecido encefálico foram mensurados por ELISA, como descrito previamente (LEITE et al., 2008). Brevemente, 50 μ l de amostra mais 50 μ l de tampão Tris foram incubados por 2hs em uma placa de microtitulação que foi previamente revestida com anti-S100B monoclonal. O anticorpo anti-S100 policlonal foi incubado por 30 min e então, o anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase foi adicionado por mais 30 min. A reação de cor com OPD foi mensurado a 492 nm. A curva padrão de S100B variou de 0,02 to1 ng/ml. Os resultados foram expressos em ng/ μ l e ng/ μ g de proteína, respectivamente.

3.4.5 Quantificação de GFAP

As fatias foram homogeneizadas em PBS (50 mM NaCl, 18 mM Na₂HPO₄, 83 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4), contendo 1 mM de EGTA e 1 mM de fluoreto de fenimetil-sulfonilo (PMSF). O conteúdo de GFAP foi mensurado por ELISA, como descrito previamente (TRAMONTINA et al., 2007). A análise de GFAP foi realizada revestindo as amostras com 100 µL contendo 70 µg de proteína mantendo-as durante a noite a 4°C. A incubação com o anti-GFAP policlonal de coelho por 2hs foi seguido pela incubação com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1h, a temperatura ambiente. A reação de cor com o-fenilenodiamina (OFD) foi mensurada a 492 nm. A curva padrão de GFAP variou de 0,1 a 10 ng/mL. Os resultados foram expressos em ng/ mg.

3.4.6 Preparação do tecido para os parâmetros de estresse oxidativo

O estriado foi homogeneizado em 10 volumes (1:10, w/v) de 20 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,4 contendo 140 mM KCl, para determinar os parâmetros de estresse oxidativo. O homogenado foi centrifugado a 750 × g por 10 min a 4 °C; o sedimento foi descartado e o sobrenadante foi imediatamente separado e utilizado para as medidas (DA CUNHA et al., 2012; SCHMITZ et al., 2012).

3.4.7 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As TBARS foram mensuradas de acordo com Ohkawa et al. (1979). Brevemente, dois eppendorfs foram adicionados, em ordem de aparição: 200 µL de tecido sobrenadante; 50 µL de SDS 8.1%; 375 µL de 20% ácido acético em solução aquosa (v/v) pH 3,5; 375 µL de 0.8% de ácido tiobarbitúrico. A mistura foi agitada e a reação foi realizada em banho maria por 1h. A mistura foi deixada arrefecer em água por 5 min, e então, centrifugada a 750 × g por 10 min. The resulting pink stained TBARS were determined spectrophotometrically at 535 nm in a Beckman DU® 800 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). A curva de calibragem foi

gerada utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. A TBARS foi calculada como nmol TBARS/mg de proteína (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

3.4.8 Ensaio de oxidação da 2',7'- diclorofluoresceína (H₂DCF)

A produção de espécies reativas foi mensurada segundo o método de LeBel et al. (1992), baseada na oxidação da 2',7'- diclorofluoresceína (H₂DCF). As amostras (60 µL) foram incubadas por 30 min a 37 °C no escuro com 240 µL de 100 µM de solução de 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCF-DA) em uma placa de 96 poços. O H₂DCF-DA é clivado por esterases celulares e a H₂DCF resultante é eventualmente oxidada por espécies reativas presentes na amostra. A última reação produz o composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) que foi mensurada a 488 nm de excitação e 525 nm de emissão e os resultados foram apresentados em nmol DCF/mg protein (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDYS, 1992).

3.4.9 Ensaio da superóxido dismutase (SOD)

O ensaio da atividade da SOD é baseado na habilidade de auto oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente da superóxido, que é o substrato para a SOD. A inibição da auto oxidação deste composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade é então indiretamente testada a 420 nm empregando o leitor de microplacas SpectraMax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). A curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão, a fim de calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Os resultados foram reportados como unidades por mg de proteína (MARKKLUND; MARKKLUND, 1974).

3.4.10 Ensaio da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi testada utilizando-se o leitor de microplacas SpectraMax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). O método é baseado no desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 240 nm em um meio de reação contendo 20 mM de H_2O_2 , 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0, e 0,1–0,3 mg proteína/mL. Uma unidade de CAT é definida como um μ mol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidade de CAT/mg de proteína (AEBI, 1984).

3.4.11 Ensaio da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi mensurada utilizando tert-butil-hidroperóxido como substrato (WENDEL, 1981). O desaparecimento da NADPH foi monitorada a 340 nm utilizando o leitor de microplacas SpectraMax M5/M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). O meio continha 2 mM de glutathiona, 0,15 U/mL de glutathiona redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de tert-butil-hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. Uma unidade de GPx é definida como um μ mol de NADPH consumido por minuto; a atividade específica é representada como unidade/mg de proteína.

3.4.12 Ensaio do conteúdo da glutathiona

O conteúdo total da glutathiona (GSH) foi determinado por um ensaio ligeiramente modificado, como descrito previamente (ALLEN et al., 2000; TIETZE, 1969). Esse ensaio detecta somente o conteúdo de glutathiona reduzido. Brevemente, as fatias de estriado foram homogenizadas em tampão fosfato de sódio (0.1 M, pH 8.0), e o tripeptídeo foi precipitado com 1,7% de ácido meta-fosfórico. O sobrenadante foi testado com o-ftaldialdeído (1 mg/mL metanol) a temperatura ambiente por 15 min. A fluorescência foi mensurada utilizando os comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. A curva de

calibração foi realizada com as soluções de glutatona padrão (0–500 μM). Os resultados da quantificação de glutatona foram expressos em pmol/mg de proteína.

3.4.13 Atividade da glutamina sintetase (GS)

O teste enzimático foi realizado como descrito previamente (DOS SANTOS et al., 2006). Brevemente, as amostras de tecido homogenizado foram adicionadas a uma mistura de reação contendo: 10 mM de MgCl_2 , 50 mM de L-glutamato, 100 mM de tampão imidazol-HCl (pH 7.4), 10 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mM de hidroxilamina-HCl e 10 mM de ATP, e então, incubados por 15 min a 37°C . A reação foi interrompida pela adição de 0,4 mL de uma solução contendo: 370 mM de cloreto férrico; 670 mM de HCl; 200 mM de ácido tricloroacético. Após a centrifugação, o sobrenadante foi mensurado a 530 nm e comparado com a absorbância gerada pelas quantidades padrões de γ -glutamilhdroxamato tratados com o reagente cloreto férrico. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}/\text{hora}$.

3.4.14 Ensaio de captação de glutamato

A captação de glutamato foi realizada de acordo com Frizzo et al. (2002); o estriado foi cortado em fatias de 400 μm de espessura com o chopper Mcillwain. Brevemente, as fatias foram pré-incubadas em solução salina equilibrada de Hank (HBSS) a 35°C por 15 min, seguido da adição de uma solução contendo 0,33 mCi/mL 1-[2,3- ^3H] glutamato com 100 μM de glutamato não marcado a 35°C . A incubação foi interrompida após 5 min com duas lavagens geladas de 1 mL HBSS, imediatamente seguido da adição de 0,5 N NaOH. A captação independente de sódio foi determinada no gelo (4°C), utilizando HBSS contendo N-metil-d-glucamina ao invés de cloreto de sódio. Tanto a captação específica quanto a não-específica foram realizadas em triplicatas. A radioatividade incorporada foi mensurada utilizando um contador de cintilação líquida (FRIZZO et al., 2002).

3.4.15 Quantificação do TNF- α

Após 6h e 24h da HIC, os níveis da expressão de TNF- α no estriado ipsilateral à lesão foi detectado pelo método de ELISA utilizando um kit comercial para TNF- α da eBioscience (San Diego, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Baseado na reação de cor do extrato do citoplasma e anticorpos, o valor da absorbância foi determinado a 450 nm em um leitor de microplacas (VIZUETE et al., 2013).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados neste estudo foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *pos hoc* de Duncan quando apropriado. Para relacionar diferentes fatores analisados, foi utilizada a Análise de Covariância (ANCOVA). Todas as variáveis estão expressas como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0.05$. Para análise dos dados foi utilizado o software SPSS 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA).

RESULTADOS

4.1 CAPÍTULO 1

Para entender a resposta celular e suas repercussões funcionais na lesão hemorrágica, foram realizadas análises comportamentais e histológica, bem como a quantificação do conteúdo de proteínas gliais e imunomarcações de células neurais no estriado e córtex ipsilesional durante o desenvolvimento da HIC.

4.1.1 Resultados funcionais após a HIC

A injeção de collagenase no estriado dorsolateral produziu disfunção motora significativa em todos os tempos estudados (24h, 72h e 7 dias). Para o cálculo do escore neurológico total foram realizadas três avaliações comportamentais e assim como no teste de preensão e teste do cilindro, os animais lesados foram comparados com animais sham controle.

4.1.1.1 Escore neurológico

Após 24h, 72h e 7 dias, todos os animais realizaram rotação ipsilateral espontânea de moderada à severa e revelaram reduzida habilidade de locomoção na viga de madeira após a HIC, indicando disfunção motora ($F_{(3,41)}=269,79$ $P<0,0001$). Entretanto, o grau do prejuízo neurológico foi mais aparente nos tempos mais agudos: 24h ($6,57\pm 0,20$) vs 72h ($5,71\pm 0,18$) pós-HIC $P\leq 0,05$; 24h ($6,57\pm 0,20$) vs 7 dias ($4,71\pm 0,18$) pós-HIC $P\leq 0,05$; 72h ($5,71\pm 0,18$) vs 7 dias ($4,71\pm 0,18$) pós-HIC $P\leq 0,05$. Todos os animais lesados foram diferentes do grupo controle ($P\leq 0,05$) (Fig. 6A).

4.1.1.2 Teste de preensão

Os animais submetidos à cirurgia de HIC não recuperaram a força dos membros anteriores. A ANOVA de uma via demonstrou uma significativa interação entre os fatores ($F_{(3,41)}=44,63$ $P<0,0001$). Os animais lesados tiveram uma clara redução da força dos membros anteriores comparado ao grupo controle ($1050,42g \pm 29,02$) 24h pós-HIC ($428,57g \pm 40,43$ $P\leq 0,05$), 72h pós-HIC ($633,81g \pm 55,77$ $P\leq 0,05$) e 7 dias pós-HIC ($675,28g \pm 65,05$ $P\leq 0,05$). Ainda, diferenças

foram encontradas entre o grupo 24h pós-HIC ($428,57g \pm 40,43$ $P \leq 0,05$) e os diferentes tempos pós-HIC ($72h = 633,81g \pm 55,77$ $P \leq 0,05$; 7 dias = $675,28g \pm 65,05$ $P \leq 0,05$) (Fig. 6B).

4.1.1.3 Teste do cilindro

A análise dos dados do teste do cilindro revelou uma diminuição significativa no uso do membro anterior contralateral à lesão após a lesão hemorrágica realizada no estriado esquerdo ($F_{(3,41)} = 36,32$ $P < 0,0001$). Houve uma evidente assimetria no uso dos membros anteriores nos grupos 24h pós-HIC ($25,00\% \pm 0,04$ $P \leq 0,05$), 72h pós-HIC ($23,71\% \pm 0,03$ $P \leq 0,05$) e 7 dias pós-HIC ($22,57\% \pm 0,03$ $P \leq 0,05$) comparado ao grupo controle ($49,70\% \pm 0,01$) (Fig. 6C).

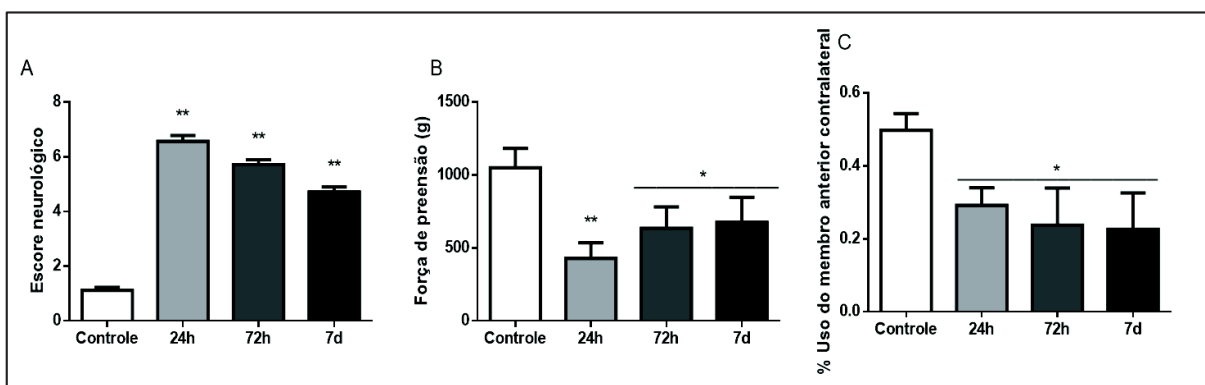


Figura 6. Efeito da HIC sobre o escore neurológico (A) teste de preensão (B) e teste docilindro (C) nos diferentes tempos pós-lesão no estriado ipsilesional ($n = 7$). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P \leq 0,05$ e ** diferença entre todos os grupos (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Duncan).

4.1.2 Volume da lesão após a HIC

Em todos os tempos, a injeção de colagenase no estriado dorsolateral produziu uma lesão encefálica significativa ($F_{(3,23)} = 26,94$ $P < 0,0001$) como ilustrado na figura 7. Após 24 horas da HIC, o hematoma comprimiu o ventrículo ipsilateral à lesão e aumentou o volume do hemisfério ipsilateral (Fig. 7B). Adicionalmente, foi evidenciado uma redução do volume da lesão 7 dias pós-HIC ($24,14mm^3 \pm 5,47$) em comparação com os grupos 24h pós-HIC ($62,69mm^3 \pm 2,57$ $P \leq 0,05$) e 72h pós-HIC ($40,36mm^3 \pm 11,59$ $P \leq 0,05$). Esses achados sugerem uma redução do hematoma e edema durante a progressão da HIC. Além disso, todos os animais lesados foram diferentes do grupo controle ($P \leq 0,05$) (Fig. 7A).

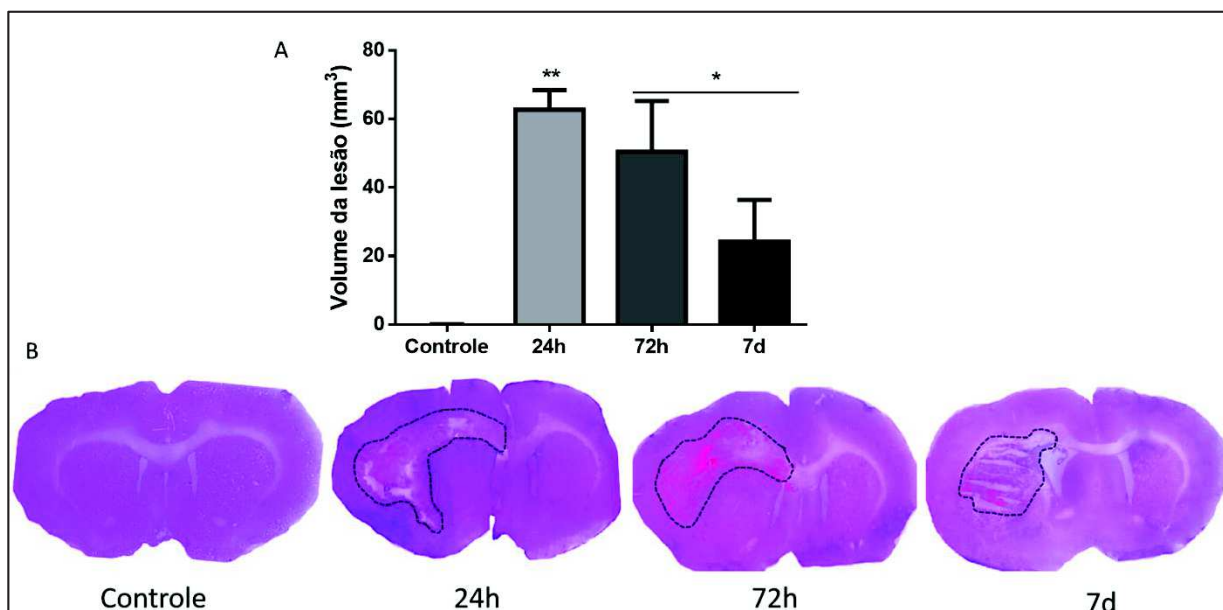


Figura 7. Efeito da HIC sobre o volume da lesão nos diferentes tempos pós-lesão (A) Imagem representativa da progressão da HIC (B) (n=3–5). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P \leq 0.05$ e ** diferença de todos os grupos (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Duncan).

4.1.3 Secreção de S100B durante o desenvolvimento da HIC

A ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo da HIC sobre o conteúdo de S100B no soro ($F_{(4,29)}=20.80$ $P < 0.0001$) e LCE ($F_{(4,31)}=11.24$ $P < 0.0001$). A análise *pos hoc* de Duncan demonstrou um aumento significativo nos níveis de S100B no soro 6h pós-HIC ($6.12\text{ng}/\mu\text{l} \pm 0.90$ $P \leq 0.05$) em comparação com os animais controle ($2.74\text{ng}/\mu\text{l} \pm 0.47$), 24h ($0.91\text{ng}/\mu\text{l} \pm 0.12$ $P \leq 0.05$), 72h ($1.21\text{ng}/\mu\text{l} \pm 0.24$ $P \leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($1.00\text{ng}/\mu\text{l} \pm 0.13$ $P \leq 0.05$) (Fig. 8A). Da mesma forma, a análise *pos hoc* de Duncan revelou um aumento significativo nos níveis de S100B no LCE 6h pós-HIC ($127.36\text{ng}/\mu\text{l} \pm 22.75$ $P \leq 0.05$) em comparação com os animais controle ($28.80\text{ng}/\mu\text{l} \pm 14.10$), 24h ($52.23\text{ng}/\mu\text{l} \pm 8.02$ $P \leq 0.05$), 72h ($24.86\text{ng}/\mu\text{l} \pm 4.69$ $P \leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($31.18\text{ng}/\mu\text{l} \pm 4.54$ $P \leq 0.05$) (Fig. 8B).

4.1.4 Conteúdo de S100B pós-HIC

A ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo da HIC sobre a expressão da S100B no estriado ($F_{(4,35)}=5.15$ $P < 0.005$). O teste *pos hoc* de Duncan demonstrou um aumento da expressão da S100B 7 dias pós-HIC ($1.34 \pm 0.25\text{ng}/\mu\text{g}$ $P \leq 0.05$) comparado com os grupos

controle ($0.87\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.13$), 6h ($0.65\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.11$ $P \leq 0.05$), 24h ($0.86\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.15$ $P \leq 0.05$) e 72h pós-HIC ($0.43\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.04$ $P \leq 0.05$) (Fig. 8C).

No córtex, A ANOVA de uma via também demonstrou um efeito significativo da HIC sobre a expressão da S100B ($F_{(4,36)}=3.28$ $P < 0.05$). Diferentemente, entretanto, o teste *pos hoc* de Duncan revelou diferença significativa 6h pós-HIC ($0.90\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.20$) comparado aos grupos controle ($0.54\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.04$ $P \leq 0.05$), 24h ($0.46\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.05$ $P \leq 0.05$), 72h ($0.52\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.05$ $P \leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($0.59\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.06$ $P \leq 0.05$) (Fig. 8D).

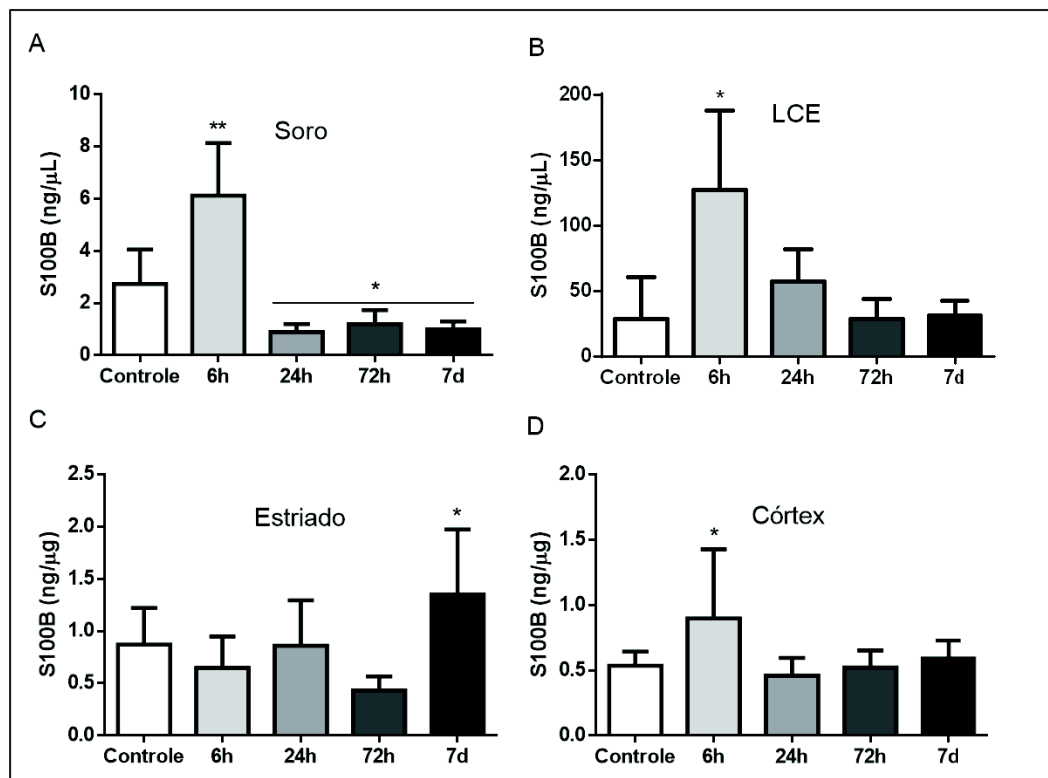


Figura 8. Efeito da HIC sobre a expressão de S100B no soro (A) LCE (B) estriado (C) e córtex (D) nos diferentes tempos pós-lesão ($n= 5-8$). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P \leq 0.05$ e ** diferença de todos os grupos (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Duncan).

4.1.5 Conteúdo de GFAP pós-HIC

A ANOVA de uma via no estriado demonstrou um efeito significativo da HIC sobre a expressão de GFAP ($F_{(4,32)}=4.77$ $P \leq 0.005$). O *post hoc* de Duncan revelou um aumento significativo 7 dias pós-HIC ($45.32\text{ng}/\text{mg} \pm 14.11$ $P \leq 0.05$) versus grupos controle ($19.67\text{ng}/\text{mg} \pm 3.01$), 6h ($15.67\text{ng}/\text{mg} \pm 4.43$ $P \leq 0.05$), 24h ($10.64\text{ng}/\text{mg} \pm 1.39$ $P \leq 0.05$) e 72h pós-HIC ($28.36\text{ng}/\text{mg} \pm 4.65$ $P \leq 0.05$), demonstrando astrocitose reativa tardia (Fig. 9A).

Similarmente, no córtex, a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo da HIC sobre a expressão de GFAP ($F_{(4,31)}=6.89$ $P\leq 0.001$), demonstrando um proeminente aumento 7 dias pós-HIC ($40.52\text{ng/mg}\pm 7.93$ $P\leq 0.05$) em comparação com os animais controle ($19.12\text{ng/mg}\pm 1.81$), 6h ($18.43.00\text{ng/mg}\pm 4.72$ $P\leq 0.05$) e 24h pós-HIC ($7.00\text{ng/mg}\pm 1.03$ $P\leq 0.05$). No entanto, 24h após a lesão ($7.00\text{ng/mg}\pm 1.03$ $P\leq 0.05$), a GFAP se mostrou reduzida em comparação com os grupos 72h ($28.87\text{ng/mg}\pm 3.31$ $P\leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($40.52\text{ng/mg}\pm 7.93$ $P\leq 0.05$) (Fig. 9B).

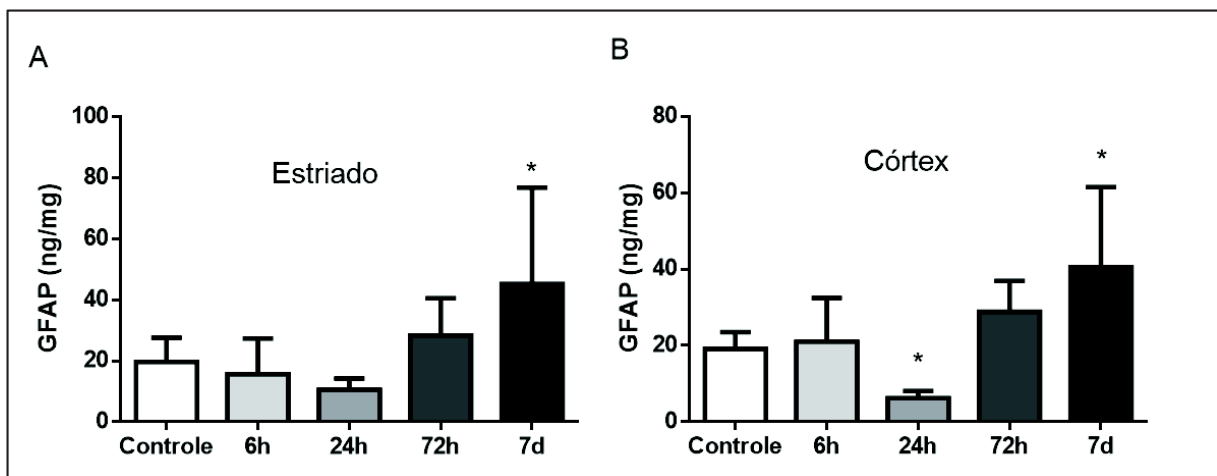


Figura 9. Efeito da HIC sobre a expressão de GFAP no estriado (A) e córtex (B) nos diferentes tempos pós-lesão (n= 5-7). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P\leq 0.05$ (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Duncan).

4.1.6 Quantificação de células neurais no estriado

Como observado na fig. 10A, houve uma redução do número de neurônios (células MAP2+) ($F_{(4,31)}=30.98$ $P<0.0001$) 6h ($1,15\%\pm 0.10$ $P\leq 0.05$), 24h ($3.95\%\pm 0.45$ $P\leq 0.05$), 72h ($4.67\%\pm 0.26$ $P\leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($3.90\%\pm 0.41$ $P\leq 0.05$) em comparação com os animais controle ($7.73\%\pm 0.90$ $P\leq 0.05$). Diferenças entre os grupos 6h pós-HIC versus 24h ($P\leq 0.05$), 72h ($P\leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($P\leq 0.05$) também foram observados, sugerindo uma maior sensibilização dos neurônios 6h pós-HIC devido a lesão e efeitos dos produtos de degradação do sangue.

Como demonstrado na fig. 10B, a ANOVA de uma via demonstrou efeito significativo da HIC sobre as células astrocitárias ($F_{(4,34)}=214.15$ $P<0.0001$), revelando um aumento significativo 24h ($2.76\%\pm 0.13$ $P\leq 0.05$), 72h ($4.98\%\pm 0.12$ $P\leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($4.94\%\pm 0.36$ $P\leq 0.05$) em comparação com os grupos não-lesão ($0.85\%\pm 0.06$) e 6h pós-HIC (0.65 ± 0.06). Diferenças adicionais foram observadas 24h pós-HIC versus 72h e 7 dias pós lesão ($P\leq 0.05$).

A ANOVA de uma via também demonstrou um efeito significativo da HIC sobre as células macrófágicas/microgliais no estriado ($F_{(4,33)}=8.60$ $P<0.0001$), revelando um aumento 6h ($5.10\%\pm 0.47$ $P\leq 0.05$), 24h ($5.56\%\pm 0.69$ $P\leq 0.05$) e 72h ($5.79\%\pm 0.47$ $P\leq 0.05$), atingindo um máximo 7 dias pós-HIC ($7.72\%\pm 0.38$ $P\leq 0.05$) em comparação com o grupo controle ($3.32\%\pm 0.43$). Diferenças adicionais foram encontradas 7 dias pós-HIC versus grupos 6h, 24h e 72h pós-HIC ($P\leq 0.05$) (Fig. 10C).

Como visualizado na figura 10D, houve um aumento progressivo no número de células apoptóticas a partir de 24h da lesão ($F_{(4,33)}=21.35$ $P<0.0001$). Ainda, o teste *post hoc* de Duncan revelou diferenças significativas entre os grupos controle ($0.25\%\pm 0.09$) e 6h pós-HIC ($0.58\%\pm 0.12$) versus 24h ($1.67\%\pm 0.10$ $P\leq 0.05$), 72h ($1.73\%\pm 0.20$ $P\leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($2.19\%\pm 0.46$ $P\leq 0.05$), compatíveis com o desenvolvimento da lesão.

O efeito da HIC sobre as células S100B positivas no estriado também foi observado ($F_{(4,34)}=11.82$ $P<0.0001$), revelando um aumento pronunciado 24h ($4.57\%\pm 0.63$ $P\leq 0.05$), 72h ($3.62\%\pm 0.36$ $P\leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($5.48\%\pm 0.92$ $P\leq 0.05$) em comparação com os grupos controle ($1.72\%\pm 0.78$) e 6h pós-HIC ($0.68\%\pm 0.08$) (Fig. 10E).

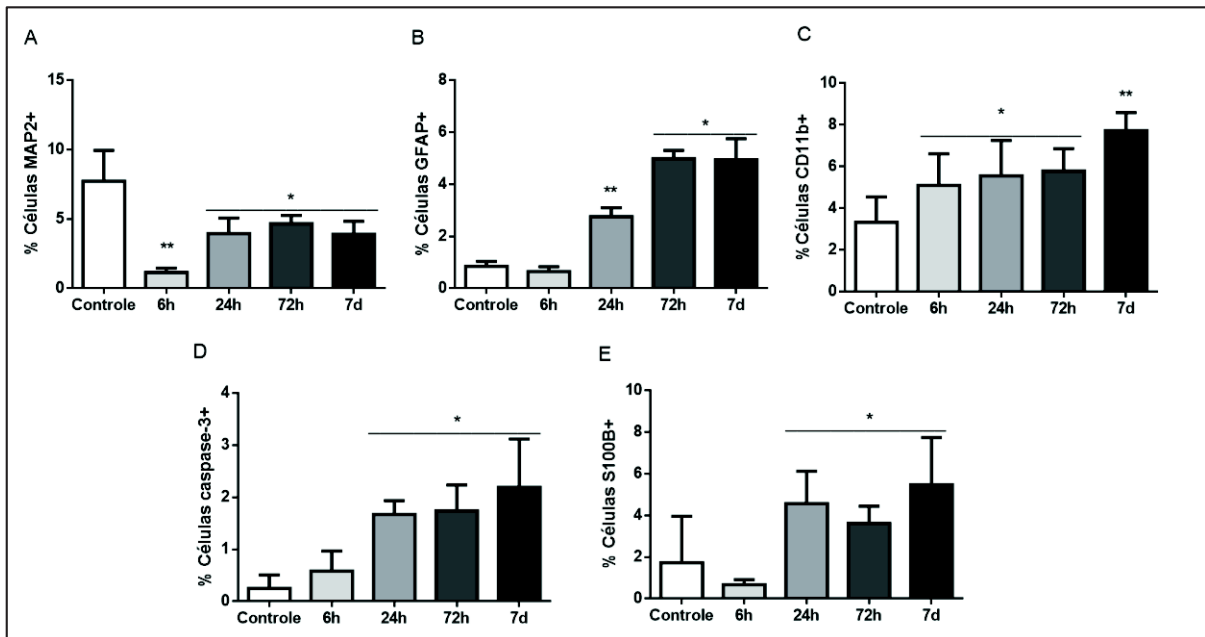


Figura 10. Efeito da HIC sobre as células neuronais (A) astrocitárias (B) macrofágicas/microgliais (C) apoptóticas (D) e S100B+ (E) no estriado ipsilesional nos diferentes tempos pós-lesão (n= 5-8). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P \leq 0.05$ e ** diferença de todos os grupos (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Duncan).

4.1.7 Quantificação de células gliais no córtex

Como observado na fig. 11A, houve um aumento pronunciado no número de astrócitos ($F_{(4,35)}=31.04$ $P < 0.0001$) 7 dias pós-HIC ($4.59\% \pm 0.25$ $P \leq 0.05$) em comparação com os grupos controle ($2.71\% \pm 0.27$ $P \leq 0.05$), 6h ($1.08\% \pm 0.12$ $P \leq 0.05$), 24h ($2.33\% \pm 0.36$ $P \leq 0.05$) e 72h pós-HIC ($2.63\% \pm 0.10$ $P \leq 0.05$). Diferenças entre os grupos 6h pós-HIC versus 24h ($P \leq 0.05$) e 72h pós-HIC ($P \leq 0.05$) também foram observadas.

Como apresentado na figura 11B, houve efeito da HIC sobre as células macrofágicas/microgliais ($F_{(4,35)}=17.54$ $P < 0.0001$), revelando um aumento pronunciado 6h pós-HIC ($17.53\% \pm 1.89$ $P \leq 0.05$) em comparação com os grupos controle ($10.78\% \pm 0.77$), 24h ($3.39\% \pm 0.27$ $P \leq 0.05$), 72h ($6.99\% \pm 0.70$ $P \leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($8.85\% \pm 0.78$ $P \leq 0.05$). Além disso, houve uma redução significativa 24h pós-HIC ($3.39\% \pm 0.27$ $P \leq 0.05$) em comparação com os grupos controle ($P \leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($P \leq 0.05$) (Fig. 11B).

Como observado na fig. 11C, houve efeito da HIC sobre as células S100B positivas ($F_{(4,33)}=54.40$ $P<0.0001$), apresentando um perfil de elevação crescente 24h ($2.70\% \pm 0.31$ $P \leq 0.05$), 72h ($3.94\% \pm 0.09$ $P \leq 0.05$) e 7 dias pós-HIC ($5.60\% \pm 0.42$ $P \leq 0.05$) em comparação com os grupos controle ($1.62\% \pm 0.13$) e 6h pós-HIC ($1.32\% \pm 0.17$).

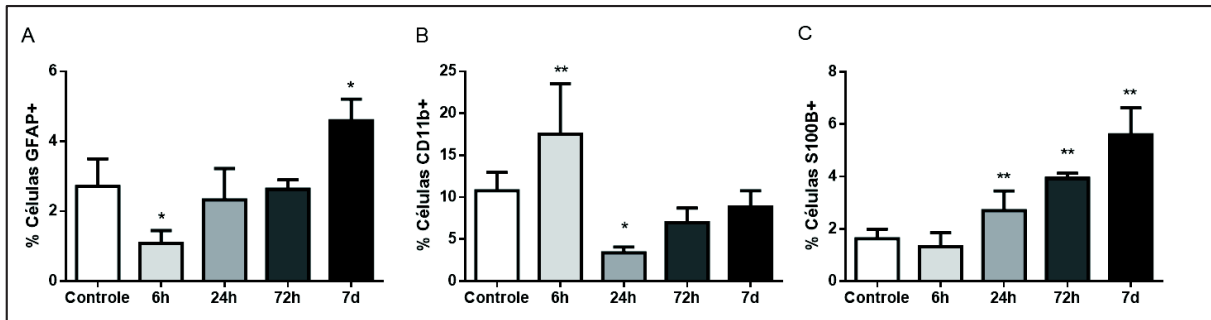


Figura 11. Efeito da HIC sobre as células astrocitárias (A) macrofágicas/microgliais (B) e S100B+ (C) nos diferentes tempos pós-lesão no córtex ($n=5-8$). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P \leq 0.05$ e ** diferença de todos os grupos (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Duncan).

4.1.8 Correlações da S100B sobre variáveis comportamentais e bioquímicas

Como um achado interessante, nossos resultados demonstram uma série de correlações da S100B sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos avaliados pelo modelo linear geral da ANOVA (ANCOVA) (Tabela 1). A partir dessa análise, foi observada uma interação positiva e significativa da proteína S100B no córtex sobre seu conteúdo no soro ($F_{(1,29)}=11.46$; $P<0.005$). A expressão de S100B no soro, por sua vez, correlacionou-se positivamente com a porcentagem de células macrofágicas/microgliais no córtex ($F_{(1,29)}=4.29$ $P<0.05$). Da mesma forma, a ANCOVA revelou uma correlação positiva das células S100B+ sobre a porcentagem de células macrofágicas/microgliais no estriado ($F_{(1,33)}=6.27$ $P<0.05$) e uma interação das células S100B+ no córtex sobre a expressão de GFAP ($F_{(1,26)}=7.74$ $P<0.05$), sugerindo um efeito importante da S100B sobre a astrocitose reativa. Além disso, foi evidenciado uma interação entre a expressão de S100B no estriado e as células S100B+ no córtex ($F_{(1,29)}=6.53$ $P<0.05$).

Adicionalmente, foi revelado uma correlação negativa da proteína S100B no estriado sobre a força de prensão dos membros anteriores dos animais experimentais, avaliados a partir do teste de prensão ($F_{(1,26)}=12,05$ $P<0.005$). Similarmente, foi encontrada uma interação da proteína S100B no córtex sobre a assimetria dos membros anteriores dos animais avaliados pelo teste do cilindro ($F_{(1,27)}=5.21$ $P<0.05$). Sugerindo, portanto, um importante papel da S100B na

ativação macrofágica/microglial e astrocitose reativa após a HIC contribuindo para a condição neurológica observada nesse estudo.

| | Teste de interveniência entre as variáveis em estudo - ANCOVA | | | | | | |
|------------------|---|---------------|------------------|------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| | S100B Soro | GFAP Córtex | % CD11b Estriado | % CD11b Córtex | % S100B Córtex | Teste de preensão | Teste do cilindro |
| S100B Soro | ----- | NS | NS | P<0.05 | NS | NS | NS |
| S100B Córtex | P<0.005 | NS | NS | NS | NS | NS | P<0.05 |
| S100B Estriado | NS | NS | NS | NS | P≤0.01 | P<0.005 | NS |
| % S100B Córtex | NS | P≤0.01 | NS | NS | NS | NS | NS |
| % S100B Estriado | NS | NS | P≤0.01 | NS | NS | NS | NS |

Tabela 1. Interações da S100B sobre variáveis comportamentais e bioquímicas.

4.2 CAPÍTULO 2

Para compreender os mecanismos de lesão durante a progressão da HIC experimental, foram analisados o estado oxidativo e a resposta aguda inflamatória do estriado ipsilesional, e a contribuição astrocitária no metabolismo do glutamato avaliado a partir da captação de glutamato e da enzima glutamina sintetase.

4.2.1 Estresse oxidativo no estriado

O nível de estresse oxidativo foi mensurado através da análise da produção de espécies reativas (DCF) e peroxidação lipídica (TBARS) no estriado ipsilateral. Em relação a produção de DCF, a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo entre os grupos analisados ($F_{(4,35)}=27.41$ $P<0.0001$). Ainda, o teste *post hoc* de Duncan revelou uma redução significativa na produção de espécies reativas 6h pós-HIC ($24.84\text{nmol/mg}\pm 1.21$), porém, 24h ($85.11\text{nmol/mg}\pm 3.77$), 72h ($88.46\text{nmol/mg}\pm 6.42$) e 7 dias pós-HIC ($57.22\text{nmol/mg}\pm 9.40$), se observou um aumento significativo da produção de DCF ($P\leq 0.05$), demonstrando um aumento do estresse oxidativo nesses períodos (Fig. 12A). Com relação a peroxidação lipídica, a ANOVA de uma via também revelou um efeito significativo entre os grupos analisados ($F_{(4,33)}=14.02$ $P<0.0001$). Entretanto, o teste *post hoc* de Duncan mostrou um significativo aumento nos níveis de TBARS no grupo 72h pós-HIC (21.04 ± 2.47 nmol/mg) comparado aos grupos não-lesão (3.78 ± 0.28 nmol/mg), 6h (2.20 ± 0.12 nmol/mg), 24h (11.09 ± 3.36 nmol/mg) e 7 dias pós-HIC (5.95 ± 1.92 nmol/mg) e um aumento significativo 24h pós-HIC comparado aos grupos não-lesão e 6h pós-HIC ($P\leq 0.05$) (Fig. 12B).

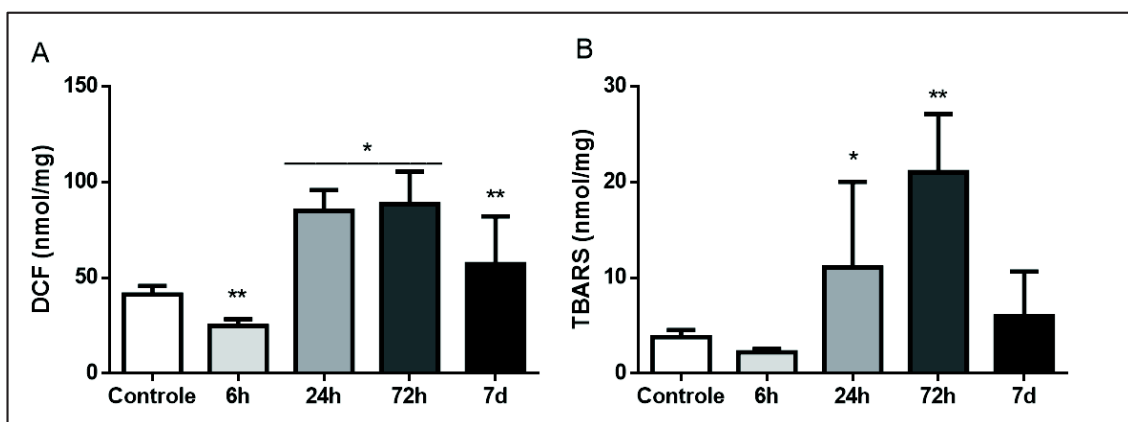


Figura 12. Efeito da HIC sobre o estresse oxidativo mensurado a partir da produção de DCF (A) e TBARS (B) nos diferentes tempos pós-lesão no estriado ($n=6-8$). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P\leq 0.05$ e ** diferença de todos os grupos (ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.2.2 Atividade das enzimas SOD, CAT e GPx após a HIC

A capacidade antioxidativa enzimática do estriado ipsilateral foi avaliada mensurando a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) nos diferentes grupos experimentais. A ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo sobre a atividade da CAT ($F_{(4,34)}=8.73$ $P<0.0001$). Após o teste *post hoc* de Duncan também se revelou um significativo aumento da atividade da CAT 24h (16.10unid/mg \pm 4.58) e 72h pós-HIC (12.18unid/mg \pm 1.82 $P\leq 0.05$) comparado ao grupo controle (1.78unid/mg \pm 0.06) e 6h pós-HIC (1.61unid/mg \pm 0.13); além disso, o grupo 24h pós-HIC se mostrou diferente do grupo 7 dias pós-HIC (5.78unid/mg \pm 0.30) (Fig. 13A).

A ANOVA de uma via mostrou uma significativa interação entre os diferentes grupos sobre a atividade da SOD ($F_{(4,35)}=7.82$ $P<0.0001$). Além disso, o teste *post hoc* de Duncan demonstrou que a atividade da SOD foi significativamente aumentada no tempo de 72h pós-HIC (10.64 \pm 1.82unid/mg $P\leq 0.05$) comparado ao grupo controle (6.60 \pm 0.26unid/mg), 6h (4.65 \pm 0.08unid/mg) e 24h pós-HIC (4.70 \pm 0.30unid/mg) (Fig. 13B).

A respeito da atividade da glutatona peroxidase (GPx), a ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo entre os grupos ($F_{(4,35)}=17.71$ $P<0.0001$). Posteriormente, o teste *post hoc* de Duncan demonstrou um aumento significativo na atividade da GPx, 6h (68.44unid/mg \pm 2.93) e 72h pós-HIC (56.56unid/mg \pm 6.55 $P\leq 0,05$) comparado aos grupos controle (29.77unid/mg \pm 1.99), 24h (29.19unid/mg \pm 3.84) e 7 dias pós-HIC (37.63unid/mg \pm 4.21) (Fig. 13C).

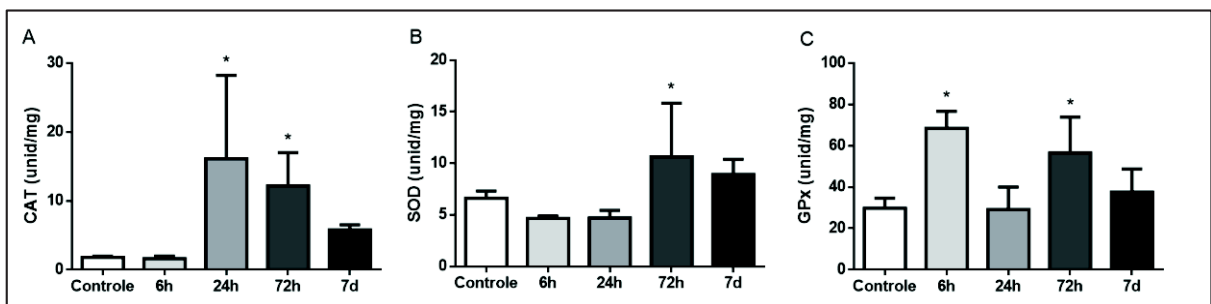


Figura 13. Efeito da HIC sobre as enzimas antioxidantes catalase (A) superóxido dismutase (B) e glutatona peroxidase (C) nos diferentes tempos pós-lesão no estriado (n= 6-8). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P\leq 0.05$ (ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.2.3 Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) no estriado

A glutathiona é um tripeptídeo considerado o composto tiol/ sulfidril não-proteico intracelular mais prevalente e importante nas células de mamíferos. Possui um importante papel na manutenção da integridade da membrana, no potencial redox, no transporte de aminoácidos e em reações detoxificantes (TORRES; OCHOA; ELIAS, 1991). Nesse estudo, a GSH foi mensurada para contribuir com os achados do estado redox no estriado após a HIC. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo sobre os grupos lesados ($F_{(4,25)}=3.73 P\leq 0.01$). O teste *post hoc* de Duncan revelou um aumento significativo no conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) nos tempos de 6h ($13.33\text{pmol/mg}\pm 4.69$) e 72h pós-HIC ($11.27\text{pmol/mg}\pm 2.00 P\leq 0.05$) em comparação com o grupo controle (Fig. 14).

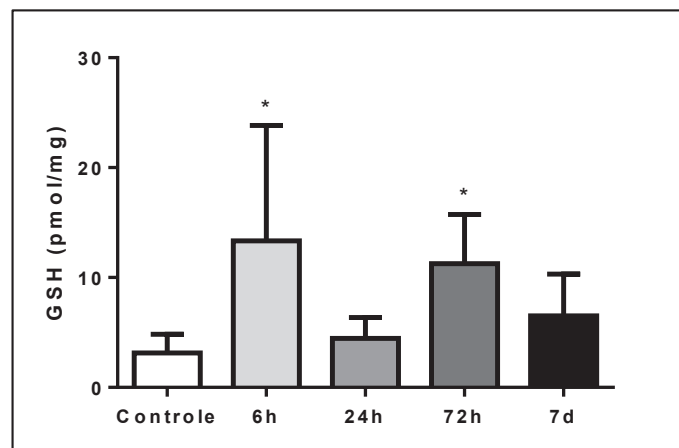


Figura 14. Efeito da HIC sobre a glutathiona reduzida nos diferentes tempos pós-lesão no estriado (n= 4-7). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P\leq 0.05$ (ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.2.4 Níveis de TNF- α pós-HIC

Neste estudo, foi mensurado os níveis de TNF- α como um indicador inflamatório agudo nos tempos de 6 e 24h pós-HIC. Os resultados revelam que o grupo 6h pós-HIC foi estatisticamente diferente dos grupos controle e 24h pós-HIC ($F_{(2,28)}=7.25 P<0.005$), indicando uma resposta inflamatória aguda ($P\leq 0,05$) (Fig. 15).

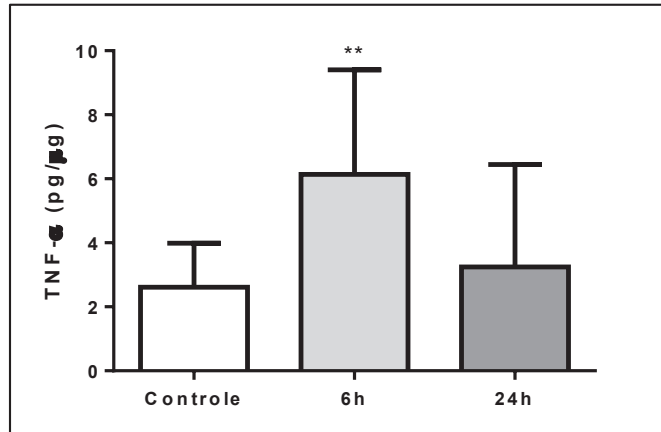


Figura 15. Efeito da HIC sobre os níveis de TNF- α nos tempos de 6h e 24h pós-lesão no estriado (n= 6-7). Os dados são expressos como média \pm EP. ** Diferença de todos os grupos, $P \leq 0.05$ (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Duncan).

4.2.5 Atividade da glutamina sintetase (GS) no estriado

A atividade da GS foi mensurada para relacioná-la com o estado redox celular e com a concentração de glutamato no meio extracelular observados após a HIC. A partir da ANOVA de uma via foi revelado um efeito significativo da HIC sobre a atividade da GS ($F_{(4,23)}=20.88$ $P < 0.0001$). Porém, o teste *post hoc* de Duncan evidenciou uma significativa diminuição na atividade da GS nos grupos 24h ($0.46 \mu\text{M}/\text{mg}/\text{hora} \pm 0.11$) e 7 dias pós-HIC ($0.85 \mu\text{M}/\text{mg}/\text{hora} \pm 0.07$ $P \leq 0.05$) comparada aos grupos controle ($1.72 \mu\text{M}/\text{mg}/\text{hora} \pm 0.07$), 6h ($1.67 \mu\text{M}/\text{mg}/\text{hora} \pm 0.17$) e 72h pós-HIC ($1.86 \mu\text{M}/\text{mg}/\text{hora} \pm 0.14$). Isso, em contrapartida, determina uma redução na conversão de glutamato em glutamina nos astrócitos, prevenindo ou contribuindo para a diminuição do dano excitotóxico causado pelo glutamato (Fig. 16).

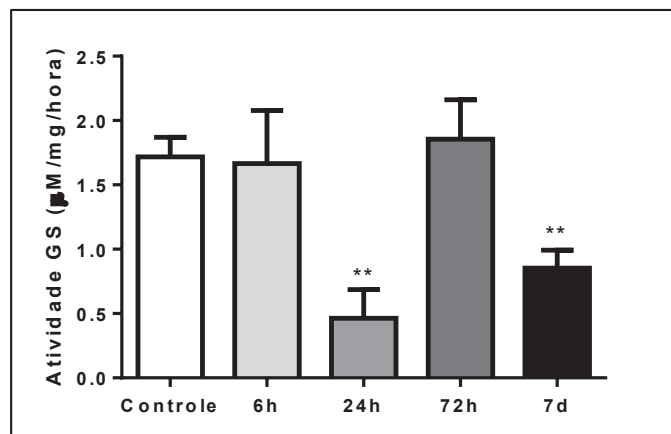


Figura 16. Efeito da HIC sobre a atividade da glutamina sintetase nos diferentes tempos pós-lesão no estriado ipsilesional (n= 4-6). Os dados são expressos como média \pm EP. ** Diferença de todos os grupos, $P \leq 0.05$ (ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Duncan).

4.2.6 Captação de glutamato no estriado

Para avaliar a capacidade de remoção do glutamato, nós realizamos a captação de glutamato no estriado ipsilateral. A ANOVA de uma via mostrou uma significativa interação entre os animais lesão e controle ($F_{(4,32)}=7.89$ $P<0.0001$). Além disso, o teste *post hoc* de Duncan revelou uma diminuição da captação de glutamato no tempo de 6h pós-HIC ($0.26\text{nmol/mg/min}\pm 0.02$), contribuindo dessa forma, para a excitotoxicidade glutamatérgica, entretanto, a partir de 24h pós-HIC, a captação de glutamato gradualmente aumentou, atingindo seu pico 7 dias pós-HIC ($1.25\text{nmol/mg/min}\pm 0.19$ $P\leq 0.05$) (Fig. 17).

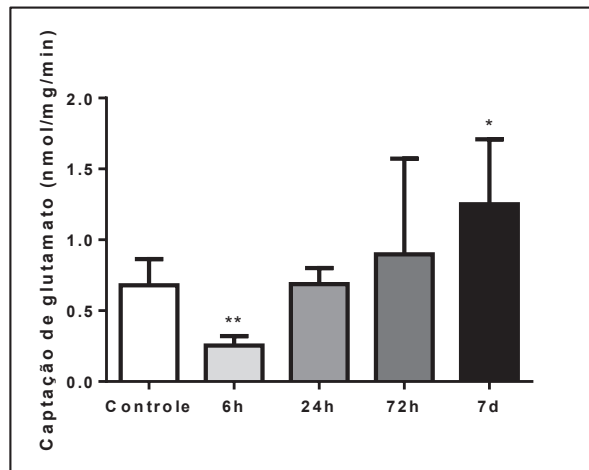


Figura 17. Efeito da HIC sobre a captação de glutamato nos diferentes tempos pós-lesão no estriado ipsilesional ($n=5-8$). Os dados são expressos como média \pm EP. * Diferença do grupo controle, $P\leq 0.05$ e ** diferença de todos os grupos (ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Duncan).

4.2.7 Interações entre o estresse oxidativo e a atividade da GS e o TNF- α

Através da análise de covariância (ANCOVA), também foram possíveis demonstrar interações negativas entre a GS e os níveis de TNF- α sobre a produção de espécies reativas (DCF) ($F_{(1,23)}=4.95$; $P<0.05$) e lipoperoxidação ($F_{(1,19)}=8.34$; $P<0.05$), respectivamente (Tabela 2).

| Teste de efeitos entre assuntos - ANCOVA | | |
|--|------------------|------------------|
| | DCF | TBARS |
| Atividade da GS | P<0.05 | NS |
| TNF- α | NS | P<0.05 |

Tabela 2. Interações do estresse oxidativo sobre a atividade da glutamina sintetase (GS) e os níveis de TNF- α .

DISCUSSÃO

A necessidade do entendimento dos mecanismos e interações celulares envolvidos na patofisiologia da HIC torna-se cada vez mais importante, uma vez que a lesão hemorrágica é responsável por altas taxas de mortalidade e morbidade (BRODERICK et al., 1999; FEIGIN et al., 2003). É conhecido que a HIC causa danos substanciais ao SNC, no entanto, pouco se sabe sobre os eventos envolvidos durante a progressão desta lesão. Nesse sentido, essa tese teve como objetivo geral avaliar os efeitos celulares, histológicos e comportamentais durante a progressão da lesão hemorrágica intracerebral e verificar possíveis mecanismos de lesão. Para este fim, esse trabalho fornece uma avaliação detalhada das respostas neuronais, astrocitárias e microgliais, relacionando-as com o estado oxidativo e a contribuição glutamatérgica observadas após a hemorragia intracerebral experimental.

No AVE hemorrágico, os déficits neurológicos agudos, tais como hemiparesia, distúrbio de consciência e desorientação são resultado da destruição tecidual direta, do efeito de massa decorrente do aumento do hematoma e do edema cerebral (DAVERAT et al., 1991). Os efeitos do dano primário produzem morte neuronal imediata pela compressão neural, porém uma parcela considerável das sequelas observadas após a lesão hemorrágica são causadas pelos produtos de coagulação do sangue e degradação da hemoglobina, provocando piora do quadro neurológico (ARONOWSKI; ZHAO, 2011; QURESHI; MENDELOW; HANLEY, 2009). Embora muitos estudos evidenciem que a HIC produz morte neuronal e gliose reativa (GONG et al., 2001; POWER et al., 2003; WANG; TSIRKA, 2005a; WASSERMAN; YANG; SCHLICHTER, 2008), até o momento, não existem trabalhos demonstrando a resposta neuronal e glial durante a progressão da hemorragia intracerebral experimental como evidenciada nesse estudo.

Após o dano encefálico, postula-se que a proteína S100B seja liberada para o espaço extracelular encefálico agindo como um sinal regulador. Durante seu pico de liberação, parece afetar astrócitos, neurônios e microglia participando na resposta inflamatória e, portanto, na morte celular (ADAMI et al., 2001; BIANCHI et al., 2007; PONATH et al., 2007). No entanto, se a lesão é branda, a S100B parece exercer funções neuroprotetoras e neurotróficas, favorecendo o crescimento de neuritos (KLIGMAN; MARSHAK, 1985; WINNINGHAM-MAJOR et al., 1989), preservando o diâmetro neuronal (IWASAKI; SHIOJIMA; KINOSHITA, 1997), estimulando a migração e proliferação astrocitária (VILLARREAL et al., 2014) e a sobrevivência celular (DONATO et al., 2009). Entretanto, seu uso como biomarcador de lesão tecidual têm sido largamente utilizado e associado ao quadro clínico neurológico (HUANG et al., 2010; MICHETTI et al., 2012; SEN; BELLI, 2007) e, por conseguinte, torna

essa proteína um alvo potencial para o estudo da progressão da HIC e de suas interações celulares. Além de seu valor diagnóstico e prognóstico, a S100B também representa um meio pelo qual o cérebro responde a um insulto, seja ele traumático, vascular, infeccioso, degenerativo ou autoimune, fazendo desta proteína, um possível alvo terapêutico (MICHETTI et al., 2012).

A citotoxicidade do sangue (WAGNER et al., 2003; XI; KEEP; HOFF, 2006), a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (QURESHI et al., 2003b), o estresse oxidativo e a inflamação (GONG; HOFF; KEEP, 2000; TANG et al., 2005; WANG; DORÉ, 2007a) desempenham papel proeminente na lesão induzida pela HIC e fornecem novas estratégias terapêuticas (ARONOWSKI; HALL, 2005; FELBERG et al., 2002; WANG et al., 2002). Por exemplo, a trombina e o ferro, componentes da sequência de coagulação e degradação da hemoglobina, respectivamente, causam danos encefálicos através da ativação microglial (FUJIMOTO et al., 2007; HUA et al., 2007). Níveis elevados de glutamato no tecido perihematoma são observados após a HIC em coelhos, resultando em rompimento e aumento da permeabilidade da BHE (WU et al., 2013). Diversos estudos envolvendo inflamação após a HIC revelam sua contribuição na morte neuronal e piora neurológica (KOOIJMAN et al., 2014; WANG; DORÉ, 2007a; WASSERMAN; SCHLICHTER, 2007). Entretanto, o efeito do estresse oxidativo e sua relação com a excitotoxicidade glutamatérgica segue um tema pobremente investigado no modelo de HIC experimental.

No primeiro capítulo apresentado nessa tese, mostramos as influências da S100B sobre as respostas celulares envolvidas na HIC após 6h, 24h, 72h e 7 dias pós-HIC, relacionando-as com os fatores bioquímicos e comportamentais. Neste trabalho evidenciamos um aumento de secreção e expressão da proteína S100B, morte neuronal, aumento de células apoptóticas, ativação microglial e astrocitose reativa após a lesão, demonstrando uma importante participação da S100B na patofisiologia da HIC.

Para comprovar o déficit sensório-motor e o quadro neurológico associado à hemorragia intracerebral induzida pela colagenase, optou-se por avaliar os resultados comportamentais durante 24h, 72h e 7 dias, uma vez que a lesão hemorrágica tende a desenvolver-se durante esse período. Diversos pesquisadores têm demonstrado que o modelo de HIC promove a piora do quadro neurológico, gerando um comportamento deficiente no uso assimétrico dos membros anteriores variando de 1 a 8 semanas (AURIAT; COLBOURNE, 2009; CLARKE et al., 2005; DEBOW et al., 2003; HARTMAN et al., 2009; MACLELLAN; COLBOURNE, 2005;

NGUYEN; ARVANITIDIS; COLBOURNE, 2008). Entretanto, este parece ser o primeiro estudo investigando e associando o efeito do modelo de HIC induzido pela colagenase sobre o comportamento e resposta celular durante sua progressão. Nossos resultados sustentam que os animais submetidos à HIC mantiveram os déficits sensório-motores analisados pelo teste de preensão e cilindro até o sétimo dia de avaliação. No entanto, houve uma melhora progressiva no quadro neurológico geral (Fig. 6), que pode ser explicado pela redução do hematoma observado na análise histológica a partir de 72h da lesão (Fig. 7).

No SNC, a S100B é liberada pelas células gliais a partir da ativação do receptor metabotrópico de glutamato de forma dependente da atividade sináptica e neural (SAKATANI et al., 2008). Ela exerce suas funções biológicas interagindo com outras proteínas, estando implicada na fosforilação de proteínas, no metabolismo energético, na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, na homeostasia do cálcio e na proliferação e diferenciação celular (DONATO et al., 2009). O aumento de sua secreção já foi observada após diversas alterações do SNC como isquemia cerebral, lesão traumática e doença de Alzheimer (BRAGA et al., 2006; ROTHERMUNDT et al., 2003; VAN ELDIK; GRIFFIN, 1994), no entanto, seu papel na HIC ainda é escasso e pouco elucidado.

Nossos resultados demonstram que os níveis de S100B no soro e LCE aumentaram radicalmente 6h pós-HIC, estando de acordo com estudos prévios (HUANG et al., 2010; LEE et al., 2015). Após lesão traumática encefálica, o aumento da S100B no LCE 6h após a lesão correlacionou-se positivamente com o pico de concentração da IL-1 β (HAYAKATA et al., 2004). Assim como a elevação transitória da S100B no soro 6h após a HIC, correlacionou-se com o aumento do volume do hematoma (TANAKA et al., 2009). Dessa forma, os nossos resultados corroboram com os dados prévios da literatura que indicam a significância da S100B como biomarcador de dano encefálico (BRUNSWICK et al., 2012; GONÇALVES; CONCLI LEITE; NARDIN, 2008; HUANG et al., 2010).

Por outro lado, os resultados referentes ao conteúdo da S100B foram distintos, dependendo da região encefálica, revelando um aumento 7 dias pós-HIC no estriado, porém uma elevação rápida 6h no córtex. Essa diferença entre regiões pode ser atribuída ao foco da lesão, uma vez que a injeção intracerebral foi realizada apenas no estriado, evidenciando, portanto, uma resposta aguda cortical. Entretanto, a partir da análise da ANCOVA podemos observar que o aumento do conteúdo da S100B no córtex está fortemente relacionado à secreção de S100B no soro, sugerindo que o tecido cortical é mais responsivo aos danos hemorrágicos e, portanto,

pode estar desempenhando um papel mais ativo inicialmente. Esses dados, adicionados a um cenário de aumento do conteúdo de GFAP e número de células S100B+ e GFAP+ tanto no córtex quanto no estriado, sugerem fortemente uma relação da S100B na astrocitose reativa, corroborando com dados prévios da literatura (DONATO et al., 2009; VILLARREAL et al., 2014).

O aumento crescente de células macrofágicas/ microgliais no estriado e, mais uma vez, a resposta aguda cortical observada, indicam reatividade microglial e uma possível resposta inflamatória mediada pela microglia. O sangue depositado no parênquima encefálico causa deformação do tecido neural e dispara uma resposta inflamatória após a HIC. Os macrófagos residentes no encéfalo, a microglia, estão proeminentemente envolvidos nessa resposta e se tornam ativados dentro de minutos após a lesão (ARONOWSKI; HALL, 2005; XUE; DEL BIGLIO, 2000). A participação das células microgliais na resposta inflamatória é relacionada com a liberação de citocinas e óxido nítrico (ON) (CHAO et al., 1993; HUNTER et al., 1992). Contudo, a remoção eficiente do hematoma também desempenhada pela microglia, é necessária para a resolução da inflamação e recuperação funcional (ZHAO et al., 2007). Nossos resultados, dessa maneira, estão de acordo com a literatura vigente e reafirmam a importância da microglia na limpeza e reorganização do tecido afetado.

Interessantemente, o aumento do conteúdo de S100B no soro produziu uma interação positiva sobre as células macrofágicas/microgliais no córtex, assim como o aumento das células S100B+ parece ter influenciado significativamente o aumento de células macrofágicas/microgliais no estriado. A interação entre S100B e RAGE parece ter um papel crítico na antecipação de um dano ou perigo iminente modulando a inflamação através da atividade da S100B sobre a microglia (SORCI et al., 2011). A S100B parece converter-se de um fenótipo neuroprotetor e neurotrófico para um neurotóxico na presença de pequena quantidade de citocinas pró-inflamatórias no início de um insulto encefálico contribuindo significativamente para a neuroinflamação. Ela parece amplificar a habilidade de citocinas como a IL-1 β e o TNF- α , acelerando a ativação microglial, contribuindo, dessa forma para a morte neuronal (BIANCHI; GIAMBANCO; DONATO, 2010).

Em contrapartida, o aumento da secreção de S100B no LCE e soro 6h pós-HIC somada à redução neuronal e aumento das células apoptóticas observadas no estriado sugerem que a S100B, agindo como sinal extracelular e regulador microglial, pode facilitar a morte celular, corroborando com estudos prévios (BIANCHI; GIAMBANCO; DONATO, 2010; MARCHI et

al., 2003; MICHETTI et al., 2012; ROTHERMUNDT et al., 2003). Em suporte a essa ideia, diversos estudos têm sugerido que o acúmulo de S100B no espaço extracelular pode ser prejudicial para astrócitos e neurônios causando sua morte por apoptose (ALLORE et al., 1988; DONATO, 2001; GRIFFIN et al., 1998; VAN ELDIK; WAINWRIGHT, 2003). Supõe-se que altas doses de S100B estimule agudamente a RAGE (receptor para o produto final de glicação avançada) causando apoptose neuronal via ativação excessiva da ERK 1/2 e dano oxidativo (HUTTUNEN et al., 2000). Além disso, a S100B parece estimular a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (ADAMI et al., 2001; HU et al., 1996; PETROVA; HU; VAN ELDIK, 2000) e participar da resposta inflamatória encefálica (KOJIMA et al., 1997) nos astrócitos e microglia contribuindo para a morte celular (HU; FERREIRA; VAN ELDIK, 1997).

Experimentos *in vitro* também têm demonstrado que a secreção de S100B, aumentada pela privação de oxigênio e glicose ou estiramento celular é independente de sua síntese (DAVEY; MURMANN; HEIZMANN, 2001; ELLIS et al., 2007; GERLACH et al., 2006), propondo que ela pode se comportar como uma proteína de padrão molecular associada ao dano, capaz de ativar a imunidade inata (BIANCHI et al., 2011; SORCI et al., 2010) de forma dependente da RAGE (HOFMANN et al., 1999; HUTTUNEN et al., 2000; VILLARREAL et al., 2011). Kojima e colaboradores (1994), utilizando a injeção intracerebral de S100B em ratos Lewis, desenvolveram o modelo de panencefalite autoimune (KOJIMA et al., 1994), confirmando a atuação da S100B em sequências inflamatórias. Dessa forma, é possível que a S100B intervenha na HIC atuando na resposta inflamatória através da interação astrócito-microglia contribuindo, assim, para a morte neuronal.

Nossos resultados também sustentam, a partir da análise de covariância, que o número de células S100B+ corticais interagiu positivamente com o conteúdo de GFAP, sugerindo que a S100B pode estar intervindo na regulação da proliferação astrocitária produzindo astrogliose reativa e efeitos deletérios dependentes da perda de sua função. Corroborando com esse achado, Villarreal e colaboradores (2014) demonstram que a exposição da S100B em um sítio de lesão produz um fenótipo característico de astrogliose reativa (VILLARREAL et al., 2014). Estudos prévios têm reportado que a exposição da S100B via RAGE pode promover hipertrofia astrogliar, aumento da mitose local e migração astrocitária para o sítio da lesão, contribuindo para a cicatriz glial (DONATO, 2001; HEIZMANN; FRITZ; SCHÄFER, 2002; VILLARREAL et al., 2014). Além disso, a exposição da S100B em astrócitos parece ativar o NF- κ B e provocar a indução de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α e IL-6 (ADAMI et al., 2001; PONATH et al., 2007; SORCI et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011). A

influência da S100B sobre a secreção de TNF- α vem sendo atribuída também à sua ligação com a RAGE (BIANCHI et al., 2007; HOFMANN et al., 1999) por pertencer à superfamília de imunoglobulinas (NEEPER et al., 1992) envolvida em respostas celulares pró-inflamatórias (HOFMANN et al., 1999). Altas concentrações da S100B no espaço extracelular encefálico podem ser alcançadas a partir da morte de astrócitos, vazamento de S100B de células gliais danificadas e/ou *clearance* defeituoso da S100B extracelular consequente à inflamação (DONATO, 2001; GRIFFIN et al., 1998; VAN ELDIK; WAINWRIGHT, 2003). Porém, outra possibilidade atribuída a atuação da S100B, é que ela pode estar desempenhando função neuroprotetora, facilitando a invasão astrocitária na lesão na tentativa de recuperação do tecido peri-infartado.

Outro resultado que emerge desse estudo está relacionado com a análise de covariância, que demonstra uma correlação negativa entre a expressão da S100B no estriado e a força de preensão dos membros anteriores dos animais analisados a partir do teste de preensão. Da mesma forma, a expressão da S100B no córtex revelou interferir na habilidade do membro contralateral à lesão nos animais submetidos a HIC analisados a partir do teste do cilindro. O fato da S100B estar implicada à diferentes insultos encefálicos e ser considerada um biomarcador de lesão tecidual, torna viável a suposição de que ela, indiretamente, possa atuar na piora comportamental a partir de sua influência na resposta macrofágica/microglial e astrocitária.

O córtex e o estriado desempenham importante função motora, regulando a iniciação do comportamento motor e influenciando padrões de movimento (SQUIRE et al., 2008). A S100B tanto no córtex quanto no estriado, correlacionaram-se positivamente às respostas celulares e, portanto, podem colaborar para os déficits motores evidenciando uma regulação dependente da via córtico-estriatal. Comprovando essa interação, a expressão da S100B no estriado correlacionou-se positivamente com as células S100B+ no córtex. Desse modo, supõe-se que a S100B no estriado, seja capaz de influenciar o resultado comportamental após a lesão, interferindo sobre as áreas corticais que diretamente controlam os neurônios motores superiores.

Estes dados expostos de forma temporal e região-dependente fortalecem e agregam informações aos achados concernentes à S100B e GFAP sobre a lesão encefálica e revelam seu importante papel na hemorragia intracerebral. A S100B durante o evento hemorrágico, parece influenciar nas respostas inflamatórias vinculadas às alterações microgliais e parece estimular

a proliferação e migração astrocitária, participando da iniciação e expansão da astrogliose reativa. A S100B, dessa forma, possui fundamental importância durante a hemorragia intracerebral e por isso deve ser melhor estudada.

No segundo capítulo dessa tese, enumeramos as evidências referentes ao estado redox e dano excitotóxico mediado pelo glutamato e as relações do astrócito na lesão hemorrágica. Ainda que esteja bem estabelecido que o acidente vascular encefálico isquêmico produz radicais livres que contribuem para a lesão tecidual e celular (LIU et al., 2003; OZKUL et al., 2007), dados sobre o evento hemorrágico ainda são escassos. Por esse motivo, descrevemos o perfil oxidativo durante a progressão da HIC no estriado ipsilateral. Para isso foi analisado o estado redox do tecido estriatal através da avaliação da produção de radicais livres e peroxidação lipídica, dos níveis de glutathione reduzida e das enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Além disso, foi avaliada a atividade da glutamina sintetase e a atividade de captação do glutamato própria dos astrócitos, o que nos deu uma ideia geral sobre a excitotoxicidade mediada pelo glutamato. Uma vez que o aumento do glutamato extracelular está relacionado com dano excitotóxico e morte celular (ZOU et al., 2010).

Nos astrócitos, o glutamato pode ser convertido a glutamina pela ação da enzima específica de astrócitos, glutamina sintetase (GS) (KOSENKO et al., 2003). A glutamina é liberada dos astrócitos na fenda sináptica e pode ser recaptada pelos neurônios, onde ela é hidrolisada pela atividade da enzima glutaminase para formar glutamato. A atividade da GS é inibida pela ação de radicais livres como peroxinitrito e peróxido de hidrogênio, uma vez que possui resíduos de cisteína que são suscetíveis ao estresse oxidativo (HERTZ; ZIELKE, 2004; RODRIGO; FELIPO, 2007). A inibição da atividade da GS foi demonstrada após a superestimulação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e ativação da óxido nítrico sintase (NOS) (RODRIGO; FELIPO, 2007). Assim, a regulação do estado redox das células é uma importante variável na manutenção da concentração do glutamato extracelular dentro de níveis fisiológicos devido a sua influência na depuração do glutamato bem como a sua subsequente conversão em glutamina (ENDO et al., 1997).

Desta forma, no segundo capítulo desta tese, revelamos que há dano oxidativo e peroxidação lipídica após a HIC induzida pela colagenase. Após o AVE, os ânions superóxido e hidroxila reagem com lipídeos insaturados das biomembranas, resultando na geração de radicais peróxido de lipídeo, hidroperóxidos de lipídeo e produtos de fragmentação tais como o malondialdeído (MDA) (CANO et al., 2003). O aumento da produção de radicais livres no

AVE agudo pode surgir de vários mecanismos como a estimulação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (LAFON-CAZAL et al., 1993), disfunção mitocondrial (BRAUGHLER; HALL, 1989; PIANTADOSI; ZHANG, 1996), ativação e indução da óxido nítrico sintase neuronal (NOS) (IADECOLA et al., 1996; LIPTON; ROSENBERG, 1994), ativação da resposta inflamatória (IADECOLA et al., 1999) e migração de neutrófilos e leucócitos que podem gerar ânions superóxido (MATSUO et al., 1995). Entretanto, existem poucas evidências concernentes ao evento hemorrágico. O que se sugere, é que haja uma importante participação do ferro na lesão induzida pela HIC (ALYASH, 2006; BAYSAL et al., 1990; HUA et al., 2000; JAREMKO et al., 2010; WAGNER; DWYER, 2004) através da reação de Fenton, gerando radicais hidroxila altamente reativos mediando, dessa forma, o dano a estruturas celulares, incluindo lipídeos e membranas, proteínas e ácidos nucleicos (POLI et al., 2004). Além da contribuição do ferro, a trombina também contribui para a piora da lesão, causando infiltração de células inflamatórias, formação de edema encefálico, ativação microglial e morte neuronal (XI; KEEP; HOFF, 2006; XI; REISER; KEEP, 2003). A ativação de células inflamatórias (INOUE et al., 2003) como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos também colaboram para o dano oxidativo. Durante ativação, os macrófagos iniciam um aumento da captação de oxigênio, dando origem a uma variedade de ERO, incluindo ânions superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (CONNER; GRISHAM, 1996). Portanto, o dano oxidativo gerado no modelo de HIC induzido pela collagenase pode ser dependente dos fatores de coagulação e degradação do sangue, assim como da ativação microglial e inflamatória instaladas após o dano.

Entretanto, diversas defesas endógenas antioxidantes como a glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (MATES; PEREZ-GOMEZ; NUNEZ DE CASTRO, 1999), encontradas principalmente nos astrócitos (BAMBRICK; KRISTIAN; FISKUM, 2004; DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000; DRINGEN, 2000; LINDENAU et al., 2000; SIMS; NILSSON; MUYDERMAN, 2004; SWANSON; YING; KAUPPINEN, 2004), têm a habilidade de combater as ERO e o dano oxidativo. Neste estudo, foi observado uma resposta singular de cada enzima (SOD, CAT, GPx) e do tripeptídeo GSH, revelando um aumento em períodos específicos após a HIC. A enzima SOD aumentou significativamente 72h da lesão; a CAT esteve elevada 24h e 72h, no entanto, a GPx e a GSH demonstraram uma elevação significativa 6h e 72h após o evento hemorrágico. Antioxidantes endógenos possuem uma importância crucial para a manutenção das funções celulares. Entretanto, sobre condições de estresse oxidativo, os antioxidantes endógenos podem não ser suficientes (RAHMAN, 2007) para reverter os déficits comportamentais evidenciados

após uma lesão (CHAN et al., 1993; FUJIMURA et al., 2001). Contudo, a ação combinada ou individual parece promover efeitos neuroprotetores. Por exemplo, a associação da SOD/CAT demonstrou ser neuroprotetora após o modelo animal de isquemia encefálica (SHARMA; GUPTA, 2007). A super expressão das enzimas Cu, Zn-SOD e GPx em camundongos transgênicos se mostraram ser mais resistentes à isquemia focal encefálica (FURLING et al., 2000; ISHIBASHI et al., 2002; WEISBROT-LEFKOWITZ et al., 1998; YANG et al., 1994). Após o modelo de isquemia/reperfusão, camundongos knockout para GPx evidenciaram um aumento do tamanho do infarto e aumento da morte celular por apoptose (CRACK et al., 2001) demonstrando seu valor neuroprotetor. Ainda, após lesão da *substância nigra pars compacta*, a depleção da GSH se mostrou induzir uma resposta compensatória na atividade da CAT e contribuir para a piora da performance em testes comportamentais, relacionando-se a disfunção sensorio-motora (DÍAZ-HUNG et al., 2014). Com base nesses dados, podemos sugerir que as defesas antioxidantes combinadas, podem ter contribuído, mesmo de forma tardia, para a redução do dano à membrana, evidenciado pela redução da lipoperoxidação 7 dias após a HIC (Fig. 12B).

Além do dano oxidativo, é evidenciado um aumento proeminente dos níveis de TNF- α 6h após a HIC, comprovando a resposta neuroinflamatória após a lesão. Teng e colaboradores (2009) sugerem que a sinalização do NF- κ B mediado pelo receptor *Toll-like 4* proporciona a ativação e regulação dessa resposta no encéfalo hemorrágico (TENG et al., 2009). A sinalização inflamatória envolve o esforço coordenado de diferentes moléculas e tipos celulares como a microglia e várias moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e enzimas inflamatórias (HICKENBOTTOM et al., 1999; ZHAO et al., 2007). Esta, por sua vez, parece influenciar no dano à membrana, aumentando a captação de oxigênio através da resposta macrófaga/microglial e dando origem a uma variedade de ERO (CONNER; GRISHAM, 1996).

Nossos resultados sustentam ainda, que há diminuição da atividade da GS 24h e 7 dias após a HIC. Através da análise de covariância, entretanto, é evidenciado uma correlação negativa entre a produção de espécies reativas e a atividade da GS, sugerindo que o estresse oxidativo gerado pela HIC reduz a atividade da glutamina sintetase (GS). A GS parece ser extremamente sensível ao estresse oxidativo, sendo inativada pela 6-hidroxi-dopamina (SCHOR, 1988), β -amilóide (BUTTERFIELD et al., 1997) ou pró-oxidantes (MA; CHAO; STADTMAN, 1999). Em cultura de astrócitos, a atividade da GS é depletada pela aplicação de cloreto ferroso (TIFFANY-CASTIGLIONI E, ROBERTS JA, 1989) ou por estresse induzido por H₂O₂ (PINTEAUX et al., 1996) ou amônia (SCHLIESS et al., 2002). Além disso, a GS possui um

papel central no fornecimento de precursores de glutamato para o neurônio, sendo crucial para o correto funcionamento do ciclo glutamato-glutamina. Uma vez inativada, a GS diminui o *clearance* do glutamato (DODD, 2002) e reduz o fornecimento de glutamina para os neurônios (HERTZ et al., 1999; POW; ROBINSON, 1994), podendo gerar excitotoxicidade glutamatérgica.

Para contribuir com os achados anteriores, a captação de glutamato foi analisada, revelando-se reduzida 6h após a HIC, sugerindo uma inabilidade do astrócito em limpar as sinapses glutamatérgicas, gerando, portanto, excitotoxicidade. Após lesão do SNC, os receptores NMDA estimulados abrem canais de cálcio promovendo o aumento deste para o meio intracelular. Níveis elevados de cálcio podem aumentar o dano induzido pelos radicais livres (BONDY; LEBEL, 1993). Após o AVE, o comprometimento do transporte de glutamato para o astrócito pode gerar excitotoxicidade (BOYCOTT et al., 2008; DALLAS et al., 2007). Assim como a inflamação e a hipóxia, independentes ou combinadas, contribuem para a excitotoxicidade glutamatérgica mediada pelo fator de transcrição NF- κ B (TAYLOR; CUMMINS, 2009; TAYLOR, 2008). Similarmente a hipóxia, a citocina inflamatória TNF- α também reduz a expressão do transportador EAAT2 (de aminoácido excitatório 2) nos astrócitos (BOYCOTT et al., 2008), contribuindo para o dano excitotóxico. No entanto, 7 dias após a lesão, o aumento na captação de glutamato indica uma tentativa de reverter o quadro excitotóxico.

No segundo capítulo desta tese, portanto, nós evidenciamos um efeito temporal da HIC sobre os mecanismos de lesão mediados pelo estresse oxidativo e glutamato, além de ressaltar a capacidade neuroprotetora de antioxidantes endógenos. De fato, a regulação da expressão de genes por meio de antioxidantes e do estado redox têm emergido como um novo alvo terapêutico (VANG; RASMUSSEN; ANDERSEN, 1997). Entretanto, ainda são necessários mais esforços para elucidar a importância dos antioxidantes endógenos na patologia hemorrágica. Ainda, a compreensão do papel do astrócito nos efeitos mediados pelo glutamato ainda permanecem questões em discussão e necessitam de mais estudos para a correta interpretação.

Com base nos dados expostos a cima, podemos afirmar que a HIC induzida pela collagenase produziu déficits sensório-motores (Fig. 6) compatíveis com o volume de lesão, sendo observado uma melhora do quadro neurológico ao longo do tempo dependente da redução do hematoma (Fig. 7). Diversas desordens neurológicas promovem alterações celulares como

morte neuronal, astrocitose reativa e ativação microglial (BAO et al., 2011; LIU; SHARP, 2012; WASSERMAN; SCHLICHTER, 2007; WASSERMAN; YANG; SCHLICHTER, 2008), no entanto, esse parece ser o primeiro estudo *in vivo* evidenciando respostas distintas da S100B no estriado e córtex e sua possível influência sobre células gliais, ilustrando seu papel durante a progressão da lesão hemorrágica. No primeiro capítulo, a proteína S100B é colocada no centro da discussão, uma vez que possui ações reguladoras sobre alvos celulares como a microglia e o astrócito (BIANCHI et al., 2011; DONATO et al., 2010). A S100B, atuando como sinal extracelular e de alarme à lesão, pode interagir com esses tipos celulares, acelerando sua ativação (microglia) e alterando seu fenótipo (astrócito). A partir dessa visão, a S100B opera indiretamente na inflamação e na morte neuronal, assim como na astrocitose reativa atuando na região peri-hematoma (VILLARREAL et al., 2014). A ação indireta, portanto, da S100B parece contribuir para o resultado funcional evidenciado nesse estudo.

A resposta inflamatória observada agudamente, a partir da avaliação dos níveis de TNF- α (Fig. 15) também parece relacionar-se com a S100B através de sua interação com a microglia e a citocina pró-inflamatória (BIANCHI; GIAMBANCO; DONATO, 2010). Essa reação inflamatória, por sua vez, demonstrou atuar no dano a membrana, deflagrando uma resposta oxidativa evidenciada pelo aumento da peroxidação lipídica no estriado ipsilesional, corroborando com estudos prévios (CONNER; GRISHAM, 1996; PIANTADOSI; ZHANG, 1996).

O estresse oxidativo (Fig. 12) observado nesse estudo, demonstrou uma piora entre 24h e 72h após a HIC, sugerindo que nesses tempos, a lesão secundária decorrente da degradação do sangue possa ser mais severa, liberando mais ferro e trombina, gerando um novo ciclo de prejuízo para o tecido neural. No entanto, a partir do insulto ao SNC, é liberado diversas moléculas que são capazes de estabilizar ou desativar radicais livres como a SOD, CAT, GPx e GSH (RAHMAN, 2007). Entretanto, as moléculas estudadas nesse estudo não foram capazes de evitar ou mesmo melhorar o resultado comportamental após a HIC, porém, supõe-se que coletivamente, elas possam ter contribuído, mesmo que tardiamente, para a melhora do estresse oxidativo.

A atividade da GS (Fig. 16) também se revelou diminuída após a HIC, supostamente mediado pelo estresse oxidativo. Entretanto, a razão de sua inibição durante 24h e 7 dias do insulto permanece uma questão a ser investigada. A hipótese inicial era que a diminuição de sua atividade provocaria um aumento de glutamato extracelular através de sua influência no

ciclo de glutamato/glutamina, porém essa afirmativa não se comprovou, uma vez que a captação de glutamato se manteve em seu nível normal ou aumentado. Ainda, a GS pode ser relacionada com a função astrocitária, visto que a redução de sua atividade frequentemente ocorre em astrócitos em proliferação no sítio da lesão neuronal (VARDIMON L, 2000). Alterações na expressão da GS também aparecem em estados patológicos que envolvem astrocitose reativa, como por exemplo, na doença de Alzheimer (ROBINSON, 2000), na isquemia cerebral (PETITO et al., 1992) e na hipóxia (SHER; HU, 1990), sugerindo um elo entre essa proteína e a resposta astrocitária à lesão.

A captação de glutamato (Fig. 17) se manteve reduzida 6h após a HIC, entretanto, 7 dias após o dano, encontrou-se aumentada. A redução da habilidade do astrócito em retirar o glutamato extracelular pode ser explicada pelo aumento dos níveis de TNF- α , que deflagra uma resposta inflamatória e oxidativa, afetando o funcionamento astrocitário. As proteínas transportadoras possuem esse importante papel de remoção, garantindo a manutenção das concentrações de glutamato em níveis reduzidos e não-tóxicos. No entanto, a captação de glutamato parece ser modulada por, virtualmente, todos os possíveis níveis, isto é, transcrição de DNA (ácido desoxirribonucleico), *splicing* e degradação de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro), síntese e direcionamento de proteínas, atividade de transporte de aminoácidos e atividade associada de canais iônicos. Além disso, uma variedade de compostos solúveis como citocinas e o próprio glutamato podem influenciar na expressão e atividade dos seus transportadores (DANBOLT, 2001). Dessa maneira, tornando essa função uma tarefa extremamente regulada e organizada no SNC, porém muito sensível à lesão.

O astrócito, portanto, apesar de possuir diferentes e necessárias funções para a manutenção da saúde neuronal, também apresenta sérias alterações após o AVE. Por exemplo, a participação astrocitária nos processos inflamatórios e sua produção de substâncias neurotóxicas potenciais como a S100B, podem aumentar o volume de lesão. Além de sua influência na morte celular neuronal durante o AVE, os astrócitos também desempenham papéis críticos durante a recuperação funcional. Além disso, seu papel neuroprotetor a partir de seu grande repertório antioxidante é um fator que não deve ser descartado quando se analisa possíveis alvos terapêuticos (CHEN; SWANSON, 2003; GIFFARD; SWANSON, 2005; SOFRONIEW, 2005; TRENDELENBURG; DIRNAGL, 2005). Entretanto, são necessários mais estudos para agregar o conhecimento acerca das diferentes facetas do astrócito após a HIC.

CONCLUSÃO

- O modelo de hemorragia intracerebral induzida por collagenase provocou:

I. Déficits sensório-motores condizentes com o volume da lesão em todos os períodos analisados.

II. Aumento da secreção e expressão de S100B (soro, LE, estriado e córtex) e conteúdo da proteína GFAP (estriado e córtex).

III. Redução de neurônios e aumento de células apoptóticas (estriado) e gliais (estriado e córtex).

IV. Alteração do estado redox com aumento do estresse oxidativo e moléculas antioxidantes endógenas (estriado).

V. Aumento dos níveis de TNF- α 6h após o dano (estriado).

VI. Redução da atividade da glutamina sintetase nos tempos de 24h e 7 dias (GS).

VII. Redução da função astrocitária de captação de glutamato 6h após a lesão e aumento 7 dias (estriado).

Os dados obtidos nesta tese nos permitem concluir que:

A HIC provoca alterações comportamentais, histológicas e celulares condizentes com o estado patológico observado clinicamente. A S100B mostrou-se mais uma vez um excelente biomarcador de lesão hemorrágica, além disso, atuou de forma distinta entre as regiões encefálicas, interagindo com as células microgliais e astrocitárias, influenciando no resultado funcional. O estresse oxidativo e o aumento de defesas antioxidantes após a HIC estão relacionados com as alterações da função astrocitária. Os eventos após a HIC são de alta complexidade, revelando interações celulares importantes, região dependente, que podem contribuir para futuras estratégias terapêuticas.

PERSPECTIVAS

- 1) Investigar o papel de estruturas relacionadas ao astrócito que podem contribuir para a excitotoxicidade glutamatérgica após a HIC;
- 2) Pesquisar o papel de estruturas relacionadas com o edema encefálico na HIC;
- 3) Verificar o efeito de fármacos sobre os resultados funcionais, histológicos e bioquímicos na HIC.

REFERÊNCIAS

ADAMI, C. et al. S100B expression in and effects on microglia. **Glia**, v. 33, n. 2, p. 131–142, 2001.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.

AGOSTINHO, P.; DUARTE, C. B.; OLIVEIRA, C. R. Impairment of excitatory amino acid transporter activity by oxidative stress conditions in retinal cells: effect of antioxidants. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, n. 2, p. 154–163., 1997.

ALLEN, S. et al. A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. **Methods in Cell Science**, v. 22, n. 4, p. 305 – 312, 2000.

ALLORE, R. et al. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. **Science**, v. 239, n. 4845, p. 1311–1313, 1988.

ALOISI, F. et al. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. **Journal of immunology**, v. 159, n. 4, p. 1604–1612, 1997.

ALTUMBABIC, M.; PEELING, J.; DEL BIGIO, M. R. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration. **Stroke**, v. 29, n. 9, p. 1917–1922, 1998.

ALVAREZ-SABÍN, J. et al. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. **Stroke**, v. 35, n. 6, p. 1316–1322, 2004.

ALYASH, A. Redox and radical reactions of hemoglobin solutions: toxicities and protective strategies. In: WINSLOW, R. (Ed.). **Blood Substitutes**. London: Academic Press, 2006. p. 197–205.

ARDIZZONE, T. D. et al. Glutamate receptor blockade attenuates glucose hypermetabolism in perihematomal brain after experimental intracerebral hemorrhage in rat. **Stroke**, v. 35, n. 11, p. 2587–2591, 2004.

ARONOWSKI, J.; HALL, C. E. New horizons for primary intracerebral hemorrhage treatment: experience from preclinical studies. **Neurological research**, v. 27, n. 3, p. 268–279, 2005.

ARONOWSKI, J.; ZHAO, X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: Secondary brain injury. **Stroke**, v. 42, n. 6, p. 1781–1786, 2011.

ASANO, T. et al. Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. **Current drug targets**, v. 4, n. 2, p. 127–142, 2005.

AURIAT, A. M.; COLBOURNE, F. Delayed rehabilitation lessens brain injury and improves recovery after intracerebral hemorrhage in rats. **Brain Research**, v. 1251, p. 262–268, 2009.

BALASINGAM, V. et al. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. **The Journal of neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 846–856, 1994.

BAMBRICK, L.; KRISTIAN, T.; FISKUM, G. Astrocyte Mitochondrial Mechanisms of Ischemic Brain Injury and Neuroprotection. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 3, p. 601–608, 2004.

BAO, G. et al. Relationship between cellular apoptosis and the expression of p75 neurotrophin receptor and tyrosine kinase A receptor in tissue surrounding haematoma in intracerebral haemorrhage. **The Journal of international medical research**, v. 39, n. 1, p. 150–160, 2011.

BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 19, n. 8, p. 819–834, 1999.

BAYSAL, E. et al. Desferrioxamine protects human red blood cells from hemin-induced hemolysis. **Free radical biology & medicine**, v. 9, n. 1, p. 5–10, 1990.

BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 281–296, 2009.

BEN-YOSEPH, O.; BOXER, P.; ROSS, B. Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 66, n. 6, p. 2329 – 2337, 1996.

BIANCHI, R. et al. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 108–118, 2007.

BIANCHI, R. et al. S100B protein stimulates microglia migration via rage-dependent up-regulation of chemokine expression and release. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 9, p. 7214–7226, 2011.

BIANCHI, R.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1. Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α . **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 4, p. 665–677, 2010.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 57–69, 2007.

BONDY, S.; LEBEL, C. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 633–642, 1993.

BOYCOTT, H. E. et al. Differential involvement of TNF α in hypoxic suppression of astrocyte glutamate transporters. **Glia**, v. 56, n. 9, p. 998–1004, 2008.

BRAGA, C. W. et al. S100B and NSE serum levels in obstructive sleep apnea syndrome. **Sleep Medicine**, v. 7, n. 5, p. 431–435, 2006.

BRAUGHLER, J. M.; HALL, E. D. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. **Free radical biology & medicine**, v. 6, n. 3, p. 289–301, 1989.

BRODERICK, J. P. et al. Ultra-early evaluation of intracerebral hemorrhage. **Journal of neurosurgery**, v. 72, n. 2, p. 195–199, 1990.

BRODERICK, J. P. et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage : A Statement for Healthcare Professionals From a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. **Stroke**, v. 30, n. 4, p. 905–915, 1999.

BRUNSWICK, A. S. et al. Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 321, n. 1-2, p. 1–10, 2012.

BUTTERFIELD, D. A et al. Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 68, n. 6, p. 2451–2457, 1997.

CABE, P. A et al. A simple recording grip strength device. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 8, n. 1, p. 101–102, 1978.

CANO, C. P. et al. Increased serum malondialdehyde and decreased nitric oxide within 24 hours of thrombotic stroke onset. **American journal of therapeutics**, v. 10, n. 6, p. 473–6, 2003.

CASTILLO, J. et al. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. **Neurology**, v. 58, n. 4, p. 624–629, 2002.

CHAN, P. H. et al. Brain infarction is not reduced in SOD-1 transgenic mice after a permanent focal cerebral ischemia. **Neuroreport**, v. 5, n. 3, p. 293–296, 1993.

CHAN, P. H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 21, n. 1, p. 2–14, 2001.

CHAO, C. C. et al. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 67, n. 2, p. 178–183, 1993.

CHEN, Y.; SWANSON, R. A. Astrocytes and brain injury. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 23, n. 2, p. 137–149, 2003.

CHEN-ROETLING, J.; LU, X.; RF, R. Targeting heme oxygenase after intracerebral hemorrhage. **Therapeutics Targets for Neurological Disease**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2015.

CHIANG, M. et al. Multiparametric analysis of cerebral substrates and nitric oxide delivery in cerebrospinal fluid in patients with intracerebral haemorrhage: correlation with hemodynamics and outcome. **Acta Neurochirurgica**, v. 148, n. 6, p. 615 – 621, 2006.

CHU, H. et al. The role of aquaporin 4 in apoptosis after intracerebral hemorrhage. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2014.

CLARKE, J. et al. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids worsens forelimb motor function after intracerebral hemorrhage in rats. **Experimental Neurology**, v. 191, n. 1, p. 119–127, 2005.

COLTON, C. A.; WILCOCK, D. M. Assessing activation states in microglia. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 9, n. 2, p. 174–91, 2010.

CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 274–277, 1996.

CRACK, P. et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, p. 1389 – 1399, 2001.

CUNNINGHAM, L. A.; WETZEL, M.; ROSENBERG, G. A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 329–339, 2005.

DA CUNHA, M. J. et al. Physical exercise reverses glutamate uptake and oxidative stress effects of chronic homocysteine administration in the rat. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 2, p. 69–74, 2012.

DALLAS, M. et al. Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 15, p. 3946–3955, 2007.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1–105, 2001.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 752–758, 2005.

DAVERAT, P. et al. Death and functional outcome after spontaneous intracerebral hemorrhage. A prospective study of 166 cases using multivariate analysis. **Stroke**, v. 22, p. 1–6, 1991.

DAVEY, G. E.; MURMANN, P.; HEIZMANN, C. W. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ Levels Regulate the Alternative Cell Density-dependent Secretion of S100B in Human Glioblastoma Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30819–30826, 2001.

DAVOUST, N. et al. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 5, p. 227–234, 2008.

DEBOW, S. B. et al. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. **Stroke**, v. 34, n. 4, p. 1021–1026, 2003.

DEL BIGIO, M. R. et al. Experimental intracerebral hemorrhage in rats. Magnetic resonance imaging and histopathological correlates. **Stroke**, v. 27, n. 12, p. 2312–2320, 1996.

DESAGHER, S.; GLOWINSKI, J.; PREMONT, J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. **The Journal of neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 2553–2562, 1996.

DHANDAPANI, K. M.; MAHESH, V. B.; BRANN, D. W. Astrocytes and brain function: implications for reproduction. **Experimental biology and medicine**, v. 228, n. 3, p. 253–260, 2003.

DÍAZ-HUNG, M.-L. et al. Sensory-motor performance after acute glutathione depletion by l-buthionine sulfoximine injection into substantia nigra pars compacta. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 286–293, 2014.

DODD, P. R. Excited to death: Different ways to lose your neurones. **Biogerontology**, v. 3, n. 1-2, p. 51–56, 2002.

DONATO, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1450, n. 3, p. 191–231, 1999.

DONATO, R. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637–668, 2001.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy research and technique**, v. 60, n. 6, p. 540–551, 2003.

DONATO, R. et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 6, p. 1008–1022, 2009.

DONATO, R. et al. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v. 2010, p. 1 – 13, 2010.

DOS SANTOS, A. Q. et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, n. 2, p. 161–167, 2006.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 6, p. 649–671, 2000.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4912–4916, 2000.

ELLIS, E. F. et al. S100B protein is released from rat neonatal neurons, astrocytes, and microglia by in vitro trauma and anti-S100 increases trauma-induced delayed neuronal injury and negates the protective effect of exogenous S100B on neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 6, p. 1463–1470, 2007.

ENDO, M. et al. Reactive astrocytes express NADPH diaphorase in vivo after transient ischemia. **Neuroscience letters**, v. 154, n. 1-2, p. 125–128, 1993.

ENDO, H. et al. A novel Na(+)-dependent amino acid transporter with a high affinity to glutamine. **Contributions to Nephrology**, v. 121, p. 31 – 36, 1997.

EROGLU, C. The role of astrocyte-secreted extracellular matrix proteins in central nervous system development and function. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 3, n. 3-4, p. 167–176, 2009.

FEIGIN, V. L. et al. Stroke epidemiology: A review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. **Lancet Neurology**, v. 2, n. 1, p. 43–53, 2003.

FELBERG, R. A. et al. Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: The “black hole” model of hemorrhagic damage. **Annals of Neurology**, v. 51, n. 4, p. 517–524, 2002.

FEWEL, M. E.; THOMPSON, B. G.; HOFF, J. T. Spontaneous intracerebral hemorrhage: a review. **Neurosurgical focus**, v. 15, n. 4, p. E1, 2003.

FISHER, C. Pathological observations in hypertensive cerebral hemorrhage. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 30, n. 3, p. 536 – 550, 1971.

FISHER, C. M. Cerebral miliary aneurysms in hypertension. **The American journal of pathology**, v. 66, n. 2, p. 313–330, 1972.

FRIZZO, DOS S. et al. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 353–363, 2002.

FUJII, Y. et al. Hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. **Journal of neurosurgery**, v. 80, n. 1, p. 51–57, 1994.

FUJIMOTO, S. et al. Thrombin induces striatal neurotoxicity depending on mitogen-activated protein kinase pathways in vivo. **Neuroscience**, v. 144, n. 2, p. 694–701, 2007.

FUJIMURA, M. et al. Reduction of copper,zinc-superoxide dismutase in knockout mice does not affect edema or infarction volumes and the early release of mitochondrial cytochrome c after permanent focal cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 889, n. 1-2, p. 208–213, 2001.

FURLING, D. et al. Impairment of synaptic transmission by transient hypoxia in hippocampal slices: improved recovery in glutathione peroxidase transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 4351–4356, 2000.

GAO, Z. et al. Microglial activation and intracerebral hemorrhage. **Acta Neurochirurgica Supplement**, v. 105, p. 51–53, 2008.

GEBEL, J. M. et al. Relative edema volume is a predictor of outcome in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 33, n. 11, p. 2636–2641, 2002.

GERLACH, R. et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. **Neuroscience**, v. 141, n. 4, p. 1697–1701, 2006.

GIFFARD, R. G.; SWANSON, R. A. Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 299–306, 2005.

GONÇALVES, C. A.; CONCLI LEITE, M.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10-11, p. 755–763, 2008.

GONG, C. et al. Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death. **Neurosurgery**, v. 48, n. 4, p. 875–883, 2001.

GONG, C.; HOFF, J. T.; KEEP, R. F. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat. **Brain research**, v. 871, n. 1, p. 57–65, 2000.

GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J. Microglia: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 89–105, 2010.

GRAHAM, D. I. et al. Recent advances in neurotrauma. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 59, n. 8, p. 641–651, 2000.

GRIFFIN, W. S. et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a "cytokine cycle" in disease progression. **Brain pathology**, v. 8, n. 1, p. 65–72, 1998.

HANISCH, U.-K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1387–1394, 2007.

HARTINGS, J. A. et al. Repetitive cortical spreading depolarizations in a case of severe brain trauma. **Neurological Research**, v. 30, n. 8, p. 876–882, 2008.

HARTMAN, R. et al. Assessing functional outcomes following intracerebral hemorrhage in rats. **Brain Research**, v. 1280, p. 148–157, 2009.

HAYAKATA, T. et al. Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury. **Shock journal**, v. 22, n. 2, p. 102–107, 2004.

HAZELL, A. S. Excitotoxic mechanisms in stroke: An update of concepts and treatment strategies. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 7-8, p. 941–953, 2007.

HEIMFARTH, L. et al. In vivo treatment with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats: Implications of MAPK and Akt pathways. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, n. 2, p. 143–152, 2012.

HEIZMANN, C. W.; FRITZ, G.; SCHÄFER, B. W. S100 proteins: structure, functions and pathology. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1356 – 1368, 2002.

HEMPHILL, J. C. et al. The ICH Score : A Simple, Reliable Grading Scale for Intracerebral Hemorrhage. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 891–897, 2001.

HERTZ, L. et al. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 57, n. 4, p. 417–428, 1999.

HERTZ, L.; ZIELKE, H. R. Astrocytic control of glutamatergic activity: Astrocytes as stars of the show. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 12, p. 735–743, 2004.

HEWETT, S. J.; CSERNANSKY, C. A.; CHOI, D. W. Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. **Neuron**, v. 13, n. 2, p. 487–494, 1994.

HICKENBOTTOM, S. L. et al. Nuclear factor-kappaB and cell death after experimental intracerebral hemorrhage in rats. **Stroke**, v. 30, n. 11, p. 2472–2478, 1999.

HINSON, S. R. et al. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1245–1250, 2012.

HOFMANN, M. A. et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell**, v. 97, n. 7, p. 889–901, 1999.

HONG, J. M. et al. Therapeutic hypothermia after recanalization in patients with acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 45, n. 1, p. 134–40, 2014.

HOSTENBACH, S. et al. Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 39–41, 2014.

HU, J. et al. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 2, p. 2543–2547, 1996.

HU, J.; FERREIRA, A.; VAN ELDIK, L. J. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. **Jornal of Neurochemistry**, v. 69, n. 6, p. 2294–2301, 1997.

HUA, Y. et al. Complement activation in the brain after experimental intracerebral hemorrhage. **Journal of neurosurgery**, v. 92, n. 6, p. 1016–1022, 2000.

HUA, Y. et al. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat. **Stroke**, v. 33, n. 10, p. 2478–2484, 2002.

HUA, Y. et al. Tumor necrosis factor-alpha increases in the brain after intracerebral hemorrhage and thrombin stimulation. **Neurosurgery**, v. 58, n. 3, p. 542–550, 2006.

HUA, Y. et al. Brain injury after intracerebral hemorrhage: The role of thrombin and iron. **Stroke**, v. 38, n. 2 PART 2, p. 759–762, 2007.

HUANG, M. et al. High S100B levels in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia hemorrhage are associated with poor outcome. **World Journal of Emergency Medicine**, v. 1, n. 1, p. 22 – 31, 2010.

HUNTER, C. A. et al. Astrocyte activation correlates with cytokine production in central nervous system of Trypanosoma brucei brucei-infected mice. **Laboratory investigation**, v. 67, n. 5, p. 635–642, 1992.

HUSEMANN, J. et al. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: Their role on microglia and other cells of the nervous system. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 195–205, 2002.

HUTTUNEN, H. J. et al. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40096–40105, 2000.

IADECOLA, C. et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 27, n. 8, p. 1373–1380, 1996.

IADECOLA, C. et al. Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. **Acta Neuropathologica**, v. 98, n. 1, p. 9–14, 1999.

ILIFF, J. J. et al. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 147, p. 111 – 147, 2012.

IMAMURA, N. et al. Neurodegeneration of substantia nigra accompanied with macrophage/microglia infiltration after intrastriatal hemorrhage. **Neuroscience Research**, v. 46, n. 3, p. 289–298, 2003.

INOUE, M. et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 23, p. 2495–2505, 2003.

ISHIBASHI, N. et al. Glutathione peroxidase inhibits cell death and glial activation following experimental stroke. **Molecular Brain Research**, v. 109, n. 1-2, p. 34–44, 2002.

IWASAKI, Y.; SHIOJIMA, T.; KINOSHITA, M. S100 beta prevents the death of motor neurons in newborn rats after sciatic nerve section. **Journal of the neurological sciences**, v. 151, n. 1, p. 7–12, 1997.

JANDER, S. et al. Focal ischaemia of the rat brain elicits an unusual inflammatory response: Early appearance of CD8+ macrophages/microglia. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 680–688, 1998.

JAREMKO, K. M. et al. Accelerated hemolysis and neurotoxicity in neuron-glia-blood clot co-cultures. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 4, p. 1063–1073, 2010.

JEONG, H.-K. et al. Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions. **Experimental neurobiology**, v. 22, n. 2, p. 59–67, 2013.

JEYASINGHAM, R. A. et al. Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 4, p. 541–548, 2001.

JI, H. H.; SANG, W. H.; SEUNG, K. L. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 1, p. 51–70, 2005.

JIAN LIU, K.; ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. **Free radical biology & medicine**, v. 39, n. 1, p. 71–80, 2005.

JIANG, Y. et al. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 22, n. 4, p. 404–410, 2002.

JICKLING, G. C. et al. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 34, n. 2, p. 185–99, 2014.

KAZUI, S. et al. Enlargement of spontaneous intracerebral hemorrhage. Incidence and time course. **Stroke**, v. 27, n. 10, p. 1783–1787, 1996.

KEEP, R. F.; HUA, Y.; XI, G. Intracerebral haemorrhage: Mechanisms of injury and therapeutic targets. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 8, p. 720–731, 2012.

KIM, J. H. et al. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 5, p. 1161–1171, 2010.

KLEIN, M. A. et al. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. **Glia**, v. 19, n. 3, p. 227–233, 1997.

KLIGMAN, D.; MARSHAK, D. R. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 20, p. 7136–7139, 1985.

KOEPPEN, A. H.; DICKSON, A. C.; SMITH, J. Heme oxygenase in experimental intracerebral hemorrhage: the benefit of tin-mesoporphyrin. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 63, n. 6, p. 587–597, 2004.

KOJIMA, K. et al. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 3, p. 817–829, 1994.

KOJIMA, K. et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ T cells specific for an astrocyte protein, S100 beta. **Journal of Neural Transmission. Supplementa**, v. 49, p. 43–51, 1997.

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 4, p. 279–289, 2008.

KOOIJMAN, E. et al. Long-term functional consequences and ongoing cerebral inflammation after subarachnoid hemorrhage in the rat. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1 – 12, 2014.

KOSENKO, E. et al. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: Modulation by NMDA receptors and nitric oxide. **Neurochemistry International**, v. 43, n. 4-5, p. 493–499, 2003.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 312–318, 1996.

LAFON-CAZAL, M. et al. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. **Nature**, v. 364, n. 6437, p. 535–537, 1993.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDYS, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, p. 227–231, 1992.

- LEE, J. Y. et al. A Role of Serum-Based Neuronal and Glial Markers as Potential Predictors for Distinguishing Severity and Related Outcomes in Traumatic Brain Injury. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 58, n. 2, p. 93–100, 2015.
- LEE, K. R. et al. Intracerebral infusion of thrombin as a cause of brain edema. **Journal of neurosurgery**, v. 83, n. 6, p. 1045–1050, 1995.
- LEE, K. R. et al. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. **Journal of neurosurgery**, v. 84, n. 1, p. 91–96, 1996a.
- LEE, K. R. et al. The role of the coagulation cascade in brain edema formation after intracerebral hemorrhage. **Acta Neurochirurgica**, v. 138, n. 4, p. 396–401, 1996b.
- LEE, K. R. et al. Seizures induced by intracerebral injection of thrombin: a model of intracerebral hemorrhage. **Journal of neurosurgery**, v. 87, n. 1, p. 73–78, 1997a.
- LEE, K. R. et al. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model. **Journal of neurosurgery**, v. 86, n. 2, p. 272–278, 1997b.
- LEE, S. T. et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway in intracerebral hemorrhage. **Brain Research**, v. 1309, p. 164–171, 2010.
- LEIRA, R. et al. Early neurologic deterioration in intracerebral hemorrhage: predictors and associated factors. **Neurology**, v. 63, n. 3, p. 461–467, 2004.
- LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93–99, 2008.
- LENNON, P. V. A. et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. **Lancet**, v. 364, n. 9451, p. 2106–2112, 2004.
- LETARTE, P. B. et al. Hemin: levels in experimental subarachnoid hematoma and effects on dissociated vascular smooth-muscle cells. **Journal of neurosurgery**, v. 79, n. 2, p. 252–255, 1993.
- LEWIS, D. K. et al. Age-related severity of focal ischemia in female rats is associated with impaired astrocyte function. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 6, 2012.
- LINDENAU, J. et al. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. **Glia**, v. 29, n. 1, p. 25–34, 2000.
- LIPTON, S. A; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **The New England journal of medicine**, v. 330, p. 613–622, 1994.
- LIU, D. Z. et al. Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury. **Annals of Neurology**, v. 67, n. 4, p. 526–533, 2010.

LIU, D.-Z.; SHARP, F. R. Excitatory and Mitogenic Signaling in Cell Death, Blood–brain Barrier Breakdown, and BBB Repair after Intracerebral Hemorrhage. **Translational Stroke Research**, v. 3, n. S1, p. 62–69, 2012.

LIU, S. et al. Hydroxyl radical formation is greater in striatal core than in penumbra in a rat model of ischemic stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 71, n. 6, p. 882–888, 2003.

LLOYD-JONES, D. et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 119, n. 3, p. 480 – 486, 2009.

LUCIUS, R.; SIEVERS, J. Postnatal retinal ganglion cells in vitro: Protection against reactive oxygen species (ROS)-induced axonal degeneration by cocultured astrocytes. **Brain Research**, v. 743, n. 1-2, p. 56–62, 1996.

LUSARDI, T. A. et al. Effect of acute calcium influx after mechanical stretch injury in vitro on the viability of hippocampal neurons. **Journal of neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 61–72, 2004.

MA, Y. S.; CHAO, C. C.; STADTMAN, E. R. Oxidative modification of glutamine synthetase by 2,2'-azobis(2- amidinopropane) dihydrochloride. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 363, n. 1, p. 129–34, 1999.

MACKENZIE, J. M.; CLAYTON, J. A. Early cellular events in the penumbra of human spontaneous intracerebral hemorrhage. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 1999.

MACLELLAN, C.; GYAWALI, S.; COLBOURNE, F. Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 82–89, 2006.

MACLELLAN, C. L. et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 28, n. 3, p. 516–525, 2008.

MACLELLAN, C. L. et al. Rodent models of intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 41, n. 10 Suppl, p. S95–S98, 2010.

MACLELLAN, C. L.; COLBOURNE, F. Mild to moderate hyperthermia does not worsen outcome after severe intracerebral hemorrhage in rats. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 25, n. 8, p. 1020–1029, 2005.

MAIER, C. M. et al. Evaluating therapeutic targets for reperfusion-related brain hemorrhage. **Annals of Neurology**, v. 59, n. 6, p. 929–938, 2006.

MAKAR, T. et al. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 62, p. 45 – 53, 1994.

MARCHI, N. et al. Serum transthyretin monomer as a possible marker of blood-to-CSF barrier disruption. **The Journal of neuroscience**, v. 23, n. 5, p. 1949–1955, 2003.

MARIGGIÓ, M. A. et al. The brain protein S-100ab induces apoptosis in PC12 cells. **Neuroscience**, v. 60, n. 1, p. 29–35, 1994.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MASUDA, T. et al. Peri-hemorrhagic degeneration accompanies stereotaxic collagenase-mediated cortical hemorrhage in mouse. **Brain Research**, v. 1355, p. 228–239, 2010.

MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595–603, 1999.

MATSUO, Y. et al. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 15, n. 6, p. 941–7, 1995.

MATSUSHITA, K. et al. Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 20, n. 2, p. 396–404, 2000.

MATZ, P. G.; LEWÉN, A.; CHAN, P. H. Neuronal, but not microglial, accumulation of extravasated serum proteins after intracerebral hemolysate exposure is accompanied by cytochrome c release and DNA fragmentation. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 21, n. 8, p. 921–928, 2001.

MAYER, S. A.; RINCON, F. Treatment of intracerebral haemorrhage. **Lancet Neurology**, v. 4, n. 10, p. 662–672, 2005.

MAYNE, M. et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor- α expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 32, n. 1, p. 240, 2001a.

MAYNE, M. et al. Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. **Annals of Neurology**, v. 49, n. 6, p. 727–735, 2001b.

MESTRINER, R. G. et al. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. **Experimental Neurology**, v. 227, n. 1, p. 53–61, 2011.

MESTRINER, R. G. et al. Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 244, p. 82–89, 2013.

MICHETTI, F. et al. The S100B protein in biological fluids: More than a lifelong biomarker of brain distress. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 5, p. 644–659, 2012.

MILLER, C. M. et al. Frameless stereotactic aspiration and thrombolysis of deep intracerebral hemorrhage is associated with reduced levels of extracellular cerebral glutamate and unchanged lactate pyruvate ratios. **Neurocritical care**, v. 6, n. 1, p. 22–29, 2007.

MIN, K.-J. et al. Astrocytes induce hemoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. **The Journal of neuroscience**, v. 26, n. 6, p. 1880–1887, 2006.

MIN, K.-J. et al. Spatial and temporal correlation in progressive degeneration of neurons and astrocytes in contusion-induced spinal cord injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 100, 2012.

MUN-BRYCE, S. et al. Recurring episodes of spreading depression are spontaneously elicited by an intracerebral hemorrhage in the swine. **Brain Research**, v. 888, n. 2, p. 248–255, 2001.

NAKAMURA, T. et al. Oxidative DNA injury after experimental intracerebral hemorrhage. **Brain Research**, v. 1039, n. 1-2, p. 30–36, 2005.

NAKAMURA, T. et al. Iron-induced oxidative brain injury after experimental intracerebral hemorrhage. **Acta Neurochirurgica, Supplementum**, n. 96, p. 194–198, 2006.

NEEPER, M. et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 21, p. 14998–15004, 1992.

NGUYEN, A. P.; ARVANITIDIS, A. P.; COLBOURNE, F. Failure of estradiol to improve spontaneous or rehabilitation-facilitated recovery after hemorrhagic stroke in rats. **Brain research**, v. 1193, p. 109–19, 2008.

NICO, B.; RIBATTI, D. Morphofunctional Aspects of the Blood-Brain Barrier. **Current Drug Metabolism**, v. 13, p. 50–60, 2012.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Neuroforum**, v. 11, n. 3, p. 95–96, 2005.

NISHINO, A. et al. Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury. **Journal of neurotrauma**, v. 10, n. 2, p. 167–179, 1993.

NOEBELS, J. . et al. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. **Histopathology of Human Epilepsy**, v. 51, n. Supplement 5, p. 1 – 5, 2010.

NOUR, M.; SCALZO, F.; LIEBESKIND, D. S. Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke. **Interventional Neurology**, v. 1, n. 3-4, p. 185–199, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OKAUCHI, M. et al. Effects of deferoxamine on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in aged rats. **Stroke**, v. 40, n. 5, p. 1858–1863, 2009.

OKAUCHI, M. et al. Deferoxamine treatment for intracerebral hemorrhage in aged rats: Therapeutic time window and optimal duration. **Stroke**, v. 41, n. 2, p. 375–382, 2010.

OZKUL, A. et al. Oxidative stress in acute ischemic stroke. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1062–1066, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th. ed. San Diego, California: Academic Press, Elsevier, 2007.

PEELING, J. et al. Effect of FK-506 on inflammation and behavioral outcome following intracerebral hemorrhage in rat. **Experimental neurology**, v. 167, n. 2, p. 341–347, 2001.

PERRY, V. H.; GORDON, S. Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. **The Journal of experimental medicine**, v. 166, n. 4, p. 1138–1143, 1987.

PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. R.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 4, p. 193–201, 2010.

PERSIDSKY, Y. et al. Blood-brain barrier: Structural components and function under physiologic and pathologic conditions. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 223–236, 2006.

PERTUSA, M. et al. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 3, p. 794–805, 2007.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–356, 1977.

PETITO, C. K. et al. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. **Brain research**, v. 569, n. 2, p. 275–280, 1992.

PETROVA, T. V.; HU, J.; VAN ELDIK, L. J. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: Differential responses of astrocyte and microglial cultures. **Brain Research**, v. 853, n. 1, p. 74–80, 2000.

PIANTADOSI, C. A.; ZHANG, J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. **Stroke**, v. 27, n. 2, p. 327–332, 1996.

PINTEAUX, E. et al. Modulation of oxygen-radical-scavenging enzymes by oxidative stress in primary cultures of rat astroglial cells. **Developmental neuroscience**, v. 18, n. 5-6, p. 397–404, 1996.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1163–1182, 2004.

PONATH, G. et al. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, n. 1-2, p. 214–222, 2007.

POW, D. V.; ROBINSON, S. R. Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. **Neuroscience**, v. 60, n. 2, p. 355–366, 1994.

POWER, C. et al. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 6, p. 731–742, 2003.

PYO, H. et al. Wortmannin enhances lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in microglia in the presence of astrocytes in rats. **Neuroscience Letters**, v. 346, n. 3, p. 141–144, 2003.

QURESHI, A. I. et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 19, p. 1450–1460, 2001.

QURESHI, A. I. et al. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. **Neurosurgery**, v. 52, n. 5, p. 1041–1048, 2003a.

QURESHI, A. I. et al. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. **Critical care medicine**, v. 31, n. 5, p. 1482–1489, 2003b.

QURESHI, A. I.; MENDELOW, A. D.; HANLEY, D. F. Intracerebral haemorrhage. **The Lancet**, v. 373, n. 9675, p. 1632–1644, 2009.

RABCHEVSKY, A. G. et al. A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 24, p. 10541–52., 1998.

RAHMAN, K. Studies on free radicals , antioxidants , and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.

RAMOS-MANDUJANO, G. et al. Thrombin Potently Enhances Swelling-Sensitive Glutamate Efflux from Cultured Astrocytes. **Glia**, v. 55, p. 917 – 925, 2007.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 119–145, 2009.

RINCON, F.; MAYER, S. A. Novel therapies for intracerebral hemorrhage. **Current opinion in critical care**, v. 10, n. 2, p. 94–100, 2004.

ROBINSON, S. R. Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 36, n. 4-5, p. 471–482, 2000.

RODRIGO, R.; FELIPO, V. Control of brain glutamine synthesis by NMDA receptors. **Frontiers in bioscience**, v. 12, p. 883–890, 2007.

ROLLAND, W. B. et al. Fingolimod reduces cerebral lymphocyte infiltration in experimental models of rodent intracerebral hemorrhage. **Experimental Neurology**, v. 241, n. 1, p. 45–55, 2013.

ROPPER, A. H. Lateral displacement of the brain and level of consciousness in patients with an acute hemispherical mass. **The New England journal of medicine**, v. 314, n. 15, p. 953–958, 1986.

ROPPER, A. H.; KING, R. B. Intracranial pressure monitoring in comatose patients with cerebral hemorrhage. **Archives of neurology**, v. 41, n. 7, p. 725–728, 1984.

ROSAND, J. et al. Warfarin-associated hemorrhage and cerebral amyloid angiopathy: a genetic and pathologic study. **Neurology**, v. 55, n. 7, p. 947–951, 2000.

ROSENBERG, G. A. et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. **Stroke**, v. 21, n. 5, p. 801–807, 1990.

ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia**, v. 39, n. 3, p. 279–291, 2002.

ROTHERMUNDT, M. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration. **Microscopy research and technique**, v. 60, n. 6, p. 614–632, 2003.

SAKATANI, S. et al. Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. **The Journal of neuroscience**, v. 28, n. 43, p. 10928–10936, 2008.

SCHÄFER, B. W.; HEIZMANN, C. W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 134–140, 1996.

SCHALLERT, T. Behavioral Tests for Preclinical Intervention Assessment. **NeuroRx**, v. 3, n. 4, p. 497–504, 2006.

SCHILLING, M. et al. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 1, p. 25–33, 2003.

SCHLIESS, F. et al. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. **The Federation of American Societies for Experimental Biology journal**, v. 16, p. 739–741, 2002.

SCHMITZ, F. et al. Methylphenidate induces lipid and protein damage in prefrontal cortex, but not in cerebellum, striatum and hippocampus of juvenile rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 27, n. 4, p. 605–612, 2012.

SCHOR, N. F. Inactivation of mammalian brain glutamine synthetase by oxygen radicals. **Brain research**, v. 456, n. 1, p. 17–21, 1988.

SCHROETER, M. et al. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. **Journal of neuroimmunology**, v. 55, n. 2, p. 195–203, 1994.

SELINFREUND, R. H. et al. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 9, p. 3554–3558, 1991.

SEN, J.; BELLI, A. S100B in neuropathologic states: The CRP of the brain? **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 7, p. 1373–1380, 2007.

SHARMA, S. S.; GUPTA, S. Neuroprotective effect of MnTMPyP, a superoxide dismutase/catalase mimetic in global cerebral ischemia is mediated through reduction of

oxidative stress and DNA fragmentation. **European Journal of Pharmacology**, v. 561, n. 1-3, p. 72–79, 2007.

SHER, P. K.; HU, S. X. Increased glutamate uptake and glutamine synthetase activity in neuronal cell cultures surviving chronic hypoxia. **Glia**, v. 3, n. 5, p. 350–7, 1990.

SIESJO, B. K.; AGARDH, C. D.; BENGTSSON, F. Free radicals and brain damage. **Cerebrovascular and brain metabolism reviews Journal**, v. 1, n. 3, p. 165–211, 1989.

SIMS, N. R.; NILSSON, M.; MUYDERMAN, H. Mitochondrial glutathione: A modulator of brain cell death. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 36, n. 4, p. 329–333, 2004.

SKRIVER EB, O. T. Tissue damage at computed tomography following resolution of intracerebral hematomas. **Acta Radiologica Diagnosis**, v. 27, n. 5, p. 495 – 500, 1986.

SLIVKA, A.; MYTILINEOU, C.; COHEN, G. Histochemical evaluation of glutathione in brain. **Brain research**, v. 409, n. 2, p. 275–284, 1987.

SMILEY, S. T.; KING, J. A; HANCOCK, W. W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. **Journal of immunology**, v. 167, n. 5, p. 2887–2894, 2001.

SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes in neural repair and protection. **The Neuroscientist**, v. 11, n. 5, p. 400–407, 2005.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 12, p. 638–647, 2009.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.

SORCI, G. et al. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, p. 1 – 13, 2010.

SORCI, G. et al. The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 3, 2011.

SORCI, G.; AGNELETTI, A. L.; DONATO, R. Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. **Neuroscience**, v. 99, n. 4, p. 773–783, 2000.

SPLETTSTOESSER, W. D.; SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes--“the enemy within”. **Microscopy research and technique**, v. 57, n. 6, p. 441–455, 2002.

SQUIRE, L. R. et al. **Fundamental Neuroscience**. Third edit ed. San Diego, California: Academic Press, 2008.

SRIRAM, K. et al. Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-

4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: Key signaling pathway for ast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19936–19947, 2004.

STENCE, N.; WAITE, M.; DAILEY, M. E. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. **Glia**, v. 33, n. 3, p. 256–266, 2001.

STREIT, S. Microglia and the response to brain injury. **Neuroinflammation — From Bench to Bedside**, p. 11 – 24, 2002.

STREIT, W. J. et al. Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurological research**, v. 27, n. 7, p. 685–691, 2005.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 6, p. 563–581, 1999.

STRIGGOW, F. et al. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 5, p. 2264–2269, 2000.

SUDLOW, C. L.; WARLOW, C. P. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration. **Stroke**, v. 28, n. 3, p. 491–499, 1997.

SUKUMARI-RAMESH, S.; ALLEYNE, C. H.; DHANDAPANI, K. M. Astrocyte-Specific Expression of Survivin after Intracerebral Hemorrhage in Mice: A Possible Role in Reactive Gliosis? **Journal of Neurotrauma**, v. 2804, p. 120925062417003, 2012.

SUMII, T.; LO, E. H. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 33, n. 3, p. 831–836, 2002.

SUZUKI, J.; EBINA, T. Sequential changes in tissue surrounding ICH. In: PIA, H.W., LONGMAID, C., ZIERSKI, J. (Ed.). **Spontaneous intracerebral hematomas**. Berlin: Springer, 1980. p. 121 – 128.

SWANSON, R. A. et al. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. **The Journal of neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 932–940, 1997.

SWANSON, R. A.; YING, W.; KAUPPINEN, T. M. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 2, p. 193–205, 2004.

SZYMANSKA, A. et al. Minocycline and intracerebral hemorrhage: Influence of injury severity and delay to treatment. **Experimental Neurology**, v. 197, n. 1, p. 189–196, 2006.

TANAKA, J. et al. Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species. **Glia**, v. 28, n. 2, p. 85–96, 1999.

TANAKA, Y. et al. Serum S100B, brain edema, and hematoma formation in a rat model of collagenase-induced hemorrhagic stroke. **Brain Research Bulletin**, v. 78, n. 4-5, p. 158–163, 2009.

TANG, J. et al. Role of NADPH oxidase in the brain injury of intracerebral hemorrhage. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, n. 5, p. 1342–1350, 2005.

TAYLOR, C. T. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. **The Journal of physiology**, v. 586, n. Pt 17, p. 4055–4059, 2008.

TAYLOR, C. T.; CUMMINS, E. P. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1177, p. 178–184, 2009.

TENG, W. et al. Activation of TLR4-mediated NFkappaB signaling in hemorrhagic brain in rats. **Mediators of inflammation**, v. 2009, p. 473276, 2009.

THRIFT, G.; DONNAN, G.; MCNEIL, J. Epidemiology of intracerebral hemorrhage. **Epidemiologic reviews**, v. 17, n. 2, p. 361 – 381, 1995.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.

TIFFANY-CASTIGLIONI E, ROBERTS JA, S.-G. L. Reduction of glutamine synthetase specific activity in cultured astroglia by ferrous chloride. **Journal of Neuroscience Research**, v. 24, p. 508–516, 1989.

TORRES, A. M.; OCHOA, J. E.; ELIAS, M. M. Role of lipid peroxidation on renal dysfunction associated with glutathione depletion. Effects of vitamin E. **Toxicology**, v. 70, n. 2, p. 163–172, 1991.

TOWER AND YOUNG. The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. **Journal of Neurochemistry**, v. 20, p. 269 – 278, 1973.

TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 282–286, 2007.

TRENDELENBURG, G.; DIRNAGL, U. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: Focus on ischemic preconditioning. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 307–320, 2005.

TROTTI, D. et al. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 11, p. 5976–5979, 1996.

TROTTI, D.; DANBOLT, N. C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: A molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 8, p. 328–334, 1998.

VAN ELDIK, L. J.; GRIFFIN, W. S. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1223, n. 3, p. 398–403, 1994.

VAN ELDIK, L. J.; WAINWRIGHT, M. S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 21, n. 3-4, p. 97–108, 2003.

VAN ROSSUM, D.; HANISCH, U. K. Microglia. **Metabolic Brain Disease**, v. 19, n. 3-4, p. 393–411, 2004.

VANG, O.; RASMUSSEN, B. F.; ANDERSEN, O. Combined effects of complex mixtures of potentially anti-carcinogenic compounds on antioxidant enzymes and carcinogen metabolizing enzymes in the rat. **Cancer letters**, v. 114, n. 1-2, p. 283–286, 1997.

VARDIMON L. Neuroprotection by glutamine synthetase. **The Israel Medical Association Journal**, v. 2, p. 46 – 51, 2000.

VAUGHAN, P. J. et al. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. **The Journal of neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 5389–5401, 1995.

VILLARREAL, A. et al. S100B alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF- κ B signaling. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, n. 2, p. 321–332, 2011.

VILLARREAL, A. et al. S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. **Journal of neurochemistry**, v. 131, p. 190 – 205, 2014.

VIZUETE, A. F. et al. Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. **Life Sciences**, v. 92, n. 17-19, p. 923–928, 2013.

VOLTERRA, A et al. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. **The Journal of neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 2924–2932, 1994.

WAGNER, K. R. et al. Protein oxidation and heme oxygenase-1 induction in porcine white matter following intracerebral infusions of whole blood or plasma. **Developmental Neuroscience**, v. 24, n. 2-3, p. 154–160, 2002.

WAGNER, K. R. et al. Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 23, n. 6, p. 629–652, 2003.

WAGNER, K. R. Modeling intracerebral hemorrhage: glutamate, nuclear factor-kappa B signaling and cytokines. **Stroke**, v. 38, n. 2 Suppl, p. 753–758, 2007.

WAGNER, K. R.; DWYER, B. E. Hematoma removal, heme, and heme oxygenase following hemorrhagic stroke. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 237–251, 2004.

WANG, C.-W.; KLIONSKY, D. J. The Molecular Mechanism of Autophagy. **Molecular Medicine**, v. 9, n. 3-4, p. 65–76, 2003.

WANG, J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 4, p. 463–477, 2010.

WANG, J.; DORÉ, S. Heme oxygenase-1 exacerbates early brain injury after intracerebral haemorrhage. **Brain**, v. 130, n. Pt 6, p. 1643–1652, 2007b.

WANG, J.; DORÉ, S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 27, n. 5, p. 894–908, 2007a.

WANG, J.; TSIRKA, S. E. Contribution of extracellular proteolysis and microglia to intracerebral hemorrhage. **Neurocritical care**, v. 3, n. 1, p. 77–85, 2005a.

WANG, J.; TSIRKA, S. E. Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 36, n. 3, p. 613–618, 2005b.

WANG, X. et al. Hemoglobin-induced cytotoxicity in rat cerebral cortical neurons: Caspase activation and oxidative stress. **Stroke**, v. 33, n. 7, p. 1882–1888, 2002.

WANG, Z.; GARDINER, N. J.; FERNYHOUGH, P. Blockade of hexokinase activity and binding to mitochondria inhibits neurite outgrowth in cultured adult rat sensory neurons. **Neuroscience Letters**, v. 434, n. 1, p. 6–11, 2008.

WARNER, D. S.; SHENG, H.; BATINIĆ-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. Pt 18, p. 3221–3231, 2004.

WARTENBERG, K. E.; MAYER, S. A. Reducing the risk of ICH enlargement. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 261, n. 1-2, p. 99–107, 2007.

WASSERMAN, J. K.; SCHLICHTER, L. C. Neuron death and inflammation in a rat model of intracerebral hemorrhage: Effects of delayed minocycline treatment. **Brain Research**, v. 1136, n. 1, p. 208–218, 2007.

WASSERMAN, J. K.; YANG, H.; SCHLICHTER, L. C. Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 1316–1328, 2008.

WASSERMAN, J. K.; ZHU, X.; SCHLICHTER, L. C. Evolution of the inflammatory response in the brain following intracerebral hemorrhage and effects of delayed minocycline treatment. **Brain Research**, v. 1180, n. 1, p. 140–154, 2007.

WATERS, P.; VINCENT, A. Detection of anti-Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: Current status of the assays. **The International of Multiple Sclerosis Journal**, v. 15, n. 3, p. 99–105, 2008.

WEIS, S. N. et al. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. **Mitochondrion**, v. 12, n. 2, p. 271–279, 2012.

WEISBROT-LEFKOWITZ, M. et al. Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. **Molecular Brain Research**, v. 53, p. 333 – 338, 1998.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325 – 333, 1981.

WILSON, J. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 75, p. 1149 – 1163, 1997.

WINNINGHAM-MAJOR, F. et al. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100?? proteins that differ in the content and position of cysteine residues. **Journal of Cell Biology**, v. 109, n. 6 I, p. 3063–3071, 1989.

WINTER, C. G. et al. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 13, p. 5865–5869, 1995.

WOO, D.; BRODERICK, J. P. Spontaneous intracerebral hemorrhage: epidemiology and clinical presentation. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 13, n. 3, p. 265–79, 2002.

WOO, M. S. et al. Genetic deletion of CD36 enhances injury after acute neonatal stroke. **Annals of Neurology**, v. 72, n. 6, p. 961–970, 2012.

WU, G. et al. Perihematoma glutamate level is associated with the blood – brain barrier disruption in a rabbit model of intracerebral hemorrhage. **Springer Plus**, v. 2, n. 358, p. 1 – 8, 2013.

WU, J. et al. Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage. **Brain Research**, v. 953, n. 1-2, p. 45–52, 2002.

WU, J. et al. Iron and Iron-Handling Proteins in the Brain after Intracerebral Hemorrhage. **Stroke**, v. 34, n. 12, p. 2964–2969, 2003.

XI, G. et al. Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 29, n. 12, p. 2580–2586, 1998.

XI, G.; KEEP, R. F.; HOFF, J. T. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats. **Journal of neurosurgery**, v. 89, n. 6, p. 991–996, 1998.

XI, G.; KEEP, R. F.; HOFF, J. T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 1, p. 53–63, 2006.

XI, G.; REISER, G.; KEEP, R. F. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: Deleterious or protective? **Journal of Neurochemistry**, v. 84, n. 1, p. 3–9, 2003.

XIONG, Z. et al. Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. **Experimental cell research**, v. 257, n. 2, p. 281–289, 2000.

XU, L.; LEE, J. E.; GIFFARD, R. G. Overexpression of bcl-2, bcl-x(L) or hsp70 in murine cortical astrocytes reduces injury of co-cultured neurons. **Neuroscience Letters**, v. 277, n. 3, p. 193–197, 1999.

XUE, M.; DEL BIGIO, M. R. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: Time course of inflammation and cell death. **Neuroscience Letters**, v. 283, n. 3, p. 230–232, 2000.

XUE, M.; DEL BIGIO, M. R. Acute tissue damage after injections of thrombin and plasmin into rat striatum. **Stroke**, v. 32, n. 9, p. 2164–2169, 2001.

YANG, G. et al. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 25, n. 1, p. 165–170, 1994.

YANG, S. et al. The role of complement C3 in intracerebral hemorrhage-induced brain injury. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 26, n. 12, p. 1490–1495, 2006.

YANG, Y. et al. Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. **Glia**, v. 59, n. 2, p. 200–207, 2011.

YENARI, M. A. et al. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: Improvement by minocycline in vivo and in vitro. **Stroke**, v. 37, n. 4, p. 1087–1093, 2006.

YONG, V. W. et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 7, p. 502–511, 2001.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 176–186, 2001.

YUDKOFF, M. et al. Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [¹⁵N]glutamate. **Journal of neurochemistry**, v. 55, n. 1, p. 137–145, 1990.

ZAZULIA, A. R. et al. Progression of mass effect after intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 30, n. 6, p. 1167–1173, 1999.

ZHAO, X. et al. Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: Role for peroxisome proliferator-activated receptor?? in microglia/macrophages. **Annals of Neurology**, v. 61, n. 4, p. 352–362, 2007.

ZHOU, Y. et al. Inflammation in intracerebral hemorrhage: From mechanisms to clinical translation. **Progress in Neurobiology**, n. 183, p. 1–20, 2013.

ZIMMER, D. B. et al. The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain Research Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 417–429, 1995.

ZOU, J. et al. Glutamine synthetase downregulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 4, p. 577 – 584, 2010.

Neuroscience

Elsevier Editorial System(tm) for

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: S100B protein interactions during experimental intracerebral hemorrhage progression

Article Type: Research Paper

Section/Category: Neurodegeneration, Neuroprotection and Disease-Oriented Neuroscience

Keywords: hemorrhagic stroke; S100B; inflammation; cellular responses.

Corresponding Author: Ms. Juliana Dalibor Neves, M.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS

First Author: Juliana Dalibor Neves, M.D.

Order of Authors: Juliana Dalibor Neves, M.D.; Eduardo Sanches; Fabrício Nicola; Adriana Vizquete; Letícia Petenuzzo; Claudia Vanzella; Dirceu Aristimunha; Régis Mestriner; Carlos Alberto Gonçalves; Carlos Alexandre Netto

Abstract: S100B is a Ca²⁺-binding protein implicated in many neurological disorders and used as a brain injury biomarker, thus considered a potential target for neuroprotection. However, its involvement in intracerebral hemorrhage (ICH) progression remains unknown. To address this issue, 3-month male Wistar rats were submitted to collagenase induced-ICH and after 6h, 24h, 72h and 7 days brain structures (striatum and cortex) and fluids (CSF and serum) were analyzed. Behavioral and histological evaluation were assessed at 24h, 72h and 7 days post-ICH. Neurological score, grasping and cylinder tests were used as behavioral endpoints. Temporal profile of S100B (brain and fluids) and GFAP (brain) were assessed by ELISA assay. Percentage of astrocyte, macrophage/microglial and S100B+ cells were analyzed by flow cytometry in striatum and cortex, and MAP2 and caspase-3 were assessed in striatum to measure the effectiveness of hemorrhagic lesion. The results demonstrate that after ICH: (1) there was persistent behavioral impairments and histological damage (2); a rapid and acute increase of S100B secretion and a delayed increase of S100B in striatum and cortex happened (3); ICH animals displayed sustained neuronal death, increased apoptotic cells, reactive astrogliosis, microglial recruitment and increased S100B positive cells in striatum and cortex (4); acute microglial response and a similar pattern of reactive astrogliosis and increase of S100B+ cells in cortex (5); S100B in striatum and cortex appeared to interact each other and influence microglial and astrocyte responses affecting behavioral outcome. We, thus suggest S100B contribute significantly to ICH progression influencing microglial and astrocyte responses.

Suggested Reviewers: Andrea Kleindients
University of Erlangen-Nürnberg, Germany
andrea.kleindienst@uk-erlangen.de

Roger Walz
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil
rogerwalz@hotmail.com

Dale Corbett
Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada
dcorbett@uottawa.ca

Opposed Reviewers:

October, 2015

Dear Dr. Editor,

Please find attached our manuscript entitled “*S100B protein interactions during experimental intracerebral hemorrhage progression*”, authored by Juliana Dalibor Neves and colleagues, which we would like to submit for publication as an Original research article in this journal. S100B is a Ca²⁺-binding protein thought to act as an intracellular regulator and injury biomarker, however, its involvement in pathological condition as intracerebral hemorrhage (ICH) remains unknown. Using techniques such as ELISA and flow cytometry, we observe an increase in S100B in striatum and cortex associated with reactive gliosis and behavioral changes during ICH lesion development, revealing that this protein could act as a mediator of the cellular response to hemorrhagic injury. Thus, we propose S100B contributes to ICH progression influencing microglial and astrocyte responses, leading to functional impairments.

We believe our findings will be of particular interest to the readership of this journal, which includes researchers studying cellular responses and mechanisms in hemorrhagic stroke. Therefore, we feel that your journal provides the most suitable platform for the dissemination of our work to the research community.

This manuscript is new and it is not being considered elsewhere. This research was conducted within the international guidelines for animal experiments and under the terms of our local legislation. All authors have read the correspondence and agreed to include their names listed as authors. In addition, we do not have any conflict interest with privates and publics institutions.

I have read and have abided by the statement of ethical standards for manuscripts submitted to Neuroscience.

Sincerely yours,

Juliana Dalibor Neves, MSc

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Departamento de bioquímica.

Porto Alegre, RS, Brazil, CEP: 90035003.

E-mail: julianadn@gmail.com

Phone: +55 51 33085558

Highlights

After ICH, the results demonstrate: persistent behavioral impairments and histological damage; a rapid and acute increase of S100B secretion and a delayed increase of S100B in striatum and cortex; sustained neuronal death, increased apoptotic cells, reactive astrogliosis, microglial recruitment and increased S100B positive cells in striatum and cortex; acute microglial response and a similar pattern of reactive astrogliosis and increase of S100B+ cells in cortex; S100B in striatum and cortex appeared to interact each other and influence microglial and astrocyte responses affecting behavioral outcome.

S100B protein interactions during experimental intracerebral hemorrhage progression

Neves, J.D.^{1,2}; Sanches, E.F.²; Nicola, F.²; Vizuite, A.²; Petenuzzo, L.²; Vanzela, C.²;
Aristimunha, D.²; Mestriner, RG³; Gonçalves, CA²; Netto C.A²

¹ Post-graduation Program of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

² Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Department of biophysics, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, RS, Brazil.

*** Corresponding author:**

Juliana Dalibor Neves, MSc.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS).

Rua Ramiro Barcelos, 2600 - anexo

ZIP-CODE: 90035-003

Porto Alegre, Brazil.

Phone/FAX: 0055-051 33085568.

e-mail: julianadn@gmail.com

Abstract

1
2 S100B is a Ca²⁺-binding protein implicated in many neurological disorders and used as
3
4 a brain injury biomarker, thus considered a potential target for neuroprotection. However,
5
6 its involvement in intracerebral hemorrhage (ICH) progression remains unknown. To
7
8 address this issue, male Wistar rats aged 3 month were submitted to collagenase induced-
9
10 ICH and after 6h, 24h, 72h and 7 days post-ICH brain structures (striatum and cortex) and
11
12 peripheral fluids (CSF and serum) were analyzed. Behavioral impairments and
13
14 histological evaluation were assessed at 24h, 72h and 7 days post-ICH. Neurological
15
16 score, grasping and cylinder tests were used as behavioral endpoints and lesion volume
17
18 was assessed using hematoxylin-eosin staining. Temporal profile of S100B expression in
19
20 the brain and fluids were assessed by ELISA assay, as well as GFAP expression in
21
22 striatum and cortex. Percentage of astrocyte, macrophage/microglial and S100B+ cells
23
24 were analyzed by flow cytometry in striatum and cortex, and MAP2 and caspase-3 were
25
26 assessed in striatum to measure the effectiveness of hemorrhagic lesion. The overall
27
28 results demonstrate that after ICH: (1) there was persistent behavioral impairments and
29
30 histological damage (2); a rapid and acute increase of S100B secretion and a delayed
31
32 increase of S100B in striatum and cortex happened (3); ICH animals displayed sustained
33
34 neuronal death, increased apoptotic cells, reactive astrogliosis, microglial recruitment and
35
36 increased S100B positive cells in striatum and cortex (4); acute microglial response and
37
38 a similar pattern of reactive astrogliosis and increase of S100B positive cells in cortex
39
40 (5); S100B in striatum and cortex appeared to interact each other and influence microglial
41
42 and astrocyte responses affecting behavioral outcome. We, thus suggest S100B contribute
43
44 significantly to ICH progression influencing microglial and astrocyte responses.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 **Key Words:** hemorrhagic stroke; S100B; inflammation; cellular responses.
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

Intracerebral hemorrhage (ICH) is a devastating stroke subtype, with high mortality and morbidity rates (Andres et al., 2008; Broderick et al., 2007; Mayer and Rincon, 2005). Although several efforts have been done to elucidate ICH mechanisms of injury and repair, it remains a disease in need of better treatment (Fiorella et al., 2015). Thus, identifying potential targets to provide an effective neuroprotection remains a major goal in the field of neurosciences (Sangha and Gonzales, 2011).

Astrocytes express S100B, a Ca^{2+} -binding protein that modulates intracellular and extracellular actions. Several studies have shown that S100B activates biochemical processes that lead to either pro-survival effects or cell death, depending on its concentration (Adami et al., 2001; Bianchi et al., 2010; Sorci et al., 2010). It is widely known that dynamics of cytoskeleton proteins, reactive astrogliosis, cell proliferation and differentiation can be linked with S100B expression (Villarreal et al., 2014). Additionally, S100B can act as an important signal for other elements in the neurovascular unit. For example, the secreted S100B exerts paracrine effects on neurons, microglia (Heizmann, 1999) and endothelial cells (Donato, 2007) as well as autocrine effects on astrocytes (Heizmann, 1999; Rothermundt et al., 2003). Previous reports have suggested a biphasic role of inflammatory responses in injury and repair after ischemic stroke (Hayakawa et al., 2010; Maki et al., 2013) which may be modulated by S100B (Donato, 2001; Rothermundt et al., 2003). Furthermore, *in vitro* experiments have found that S100B efflux is increased by cellular stretching, an effect that is independent of *de novo* S100B protein synthesis (Davey et al., 2001; Ellis et al., 2007; Gerlach et al., 2006; Pinto et al., 2000). However, some studies have shown that S100B could activate innate immune system like as damage-associated molecular pattern (DAMP) factor contributing for the injury progression (Bianchi et al., 2011; Sorci et al., 2010).

1 Cerebrospinal fluid (CSF) and serum levels of S100B, released from glial cells,
2 has been described as a promising biomarker of brain damage (Lynch et al., 2004; Tanaka
3 et al., 2009) displaying an pronounce acute increase after mild and moderate brain damage
4 and a sustained increase after severe CNS injury (Worthmann et al., 2010). This protein
5 levels may be associated with diagnosis and prognosis of several neurological diseases,
6 such as ischemic stroke and traumatic brain injury (Rothermundt et al., 2003). However,
7 to the best of our knowledge, there are no previous studies evaluating S100B expression
8 profile and its pathological interactions during the ICH progression.
9

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19 Present study was designed to assess the temporal profile of S100B expression in
20 the brain and fluids (CSF and serum) after a experimental hemorrhagic stroke in the rat
21 (Mestriner et al., 2011; G. A. Rosenberg et al., 1990), as well as its interaction with cell
22 survival rate of neurons, astrocytes and microglia, glial fibrillary acidify protein (GFAP)
23 expression pattern, behavioral deficits and lesion volume.
24
25
26
27
28
29
30

31 The working hypothesis is that hemorrhagic stroke will produce a sharp increase
32 of S100B secretion and, thus, will contribute to the spread of inflammation after the
33 damage. Extracellular S100B is known to affect astrocytic, neuronal and microglial
34 activities and relate to the course of brain injury (Bianchi et al., 2010). Therefore, it is
35 conceivable that extracellular S100B will contribute to the inflammatory response after
36 experimental ICH.
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **Materials and Methods**

46
47
48 All procedures and the experimental design were approved by the University
49 Ethics Committee (project number 23976), and are in accordance with the Guidelines for
50 Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA)
51 and with National Animal Experimentation Control Board (CONCEA). Efforts were
52 made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals needed.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Experimental design

1
2 Adult male Wistar rats ($N=65$) were used in the experiments. They were obtained
3
4 from a local colony at approximately 3 months of age (300–350g) and housed in groups
5
6 of 4–5 in Plexiglas cages under standard laboratory condition (12 h light/dark cycle with
7
8 lights off at 7:30 p.m. and controlled temperature in 22 ± 2 °C). Water and standard
9
10 laboratory chow were provided *ad libitum*. Firstly, we evaluated the time-dependent
11
12 effect of ICH on motor behavior performance and volume lesion ($n=28$). Rats were
13
14 divided in 4 groups: control, 24h post-ICH, 72h post-ICH and 7 days post-ICH.
15
16 Neurological score, grasping, cylinder test and lesion volume were assessed at these same
17
18 endpoints by an investigator blinded to the experimental groups. In the second
19
20 experiment, were evaluated the S100B temporal profile and its relationship with different
21
22 covariates involved in ICH progression ($n=37$). All biochemical measures were analyzed
23
24 at 6h, 24h, 72h and 7 days post-ICH. For evaluate specific cell subpopulations, were
25
26 assessed the S100B+, GFAP+ and CD11+ cells in striatum and cortex. The MAP2+ and
27
28 caspase-3+ cells were assessed only in striatum as a measure of the effectiveness of
29
30 hemorrhagic lesion. As a measure of peripheral S100B expression, were analyzed CSF
31
32 and serum.
33
34
35
36
37
38
39
40

Intracerebral hemorrhage

41
42
43 Animals were anesthetized with 4% halothane in 30% oxygen and 70% nitrous
44
45 oxide, and maintained in a stereotaxic frame with 2% halothane for ICH surgery. A
46
47 midline incision was made in the scalp (between the Bregma and Lambda landmarks) and
48
49 a burr hole was then drilled in the skull 3.6 mm lateral to Bregma in the left side. Then, a
50
51 26-gauge needle (Hamilton, Reno, NV, USA) was inserted 6.0 mm deep into the hole and
52
53 0.2 U of bacterial collagenase type-IVs (Sigma-Aldrich, USA) diluted in 1.0 μ L saline
54
55 buffer was infused into the striatum (C. L. MacLellan et al., 2006; MacLellan et al., 2008;
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 G. A. Rosenberg et al., 1990; Szymanska et al., 2006) over 5 min. The needle was kept
2 in position for an additional 5 min period and then slowly removed to prevent backflow
3
4 (Szymanska et al., 2006). Non-injury animals were used as control for behavioral,
5
6 histological and biochemical analysis. Body temperature was maintained between 36.5
7
8 °C and 37.5 °C throughout the surgery using a self-regulating heating blanket (Letica,
9
10 Spain).

11 *Behavioral assessment*

12 Behavioral tests described below were performed with a sample of seven rats per
13
14 group (n=28).

15 *Neurologic Score*

16 Neurological score (spontaneous ipsilateral rotation and beam walk ability) was
17
18 designed to rate motor dysfunction into five degrees of increasing severity: Grade 0, 1, 2,
19
20 3, and 4. Spontaneous ipsilateral rotation was assessed with the rat being held by the tail
21
22 for 10 sec. The beam walk ability test was repeated three times for adaptation (before the
23
24 surgery) and the test was performed in a single trial at each evaluated endpoint
25
26 (Altumbabic et al., 1998; Imamura et al., 2003).

27 *Grasping test*

28 The grasping test was performed as previously described (Jeyasingham et al.,
29
30 2001). Briefly, animals were exposed to a rigid horizontal bar about 30 cm into the air,
31
32 which they immediately grasp with the forepaws. At this point, the tail is lowered until
33
34 the body is horizontal and the animal is pulled away from the bar with a steady pull, until
35
36 it releases the bar. The values of 3 trials were recorded at each endpoint and an average
37
38 of all readings was calculated as the grip strength score (Cabe et al., 1978).

Asymmetrical forelimb use (cylinder test)

Animals were placed into a plexiglas cylinder (20 cm diameter×40 cm high) on a glass tabletop and videotaped from below with an angled mirror. Spontaneous ipsilateral and contralateral forelimb wall contacts were recorded for 2 min. The average contralateral forelimb contacts was divided by the sum of contacts of the ipsilateral and contralateral forelimbs and multiplied by hundred. Rats that made fewer than 12 independent wall touches were excluded (C. L. MacLellan et al., 2006; Schallert, 2006).

Histological Assessment

Animals were deeply anesthetized as routinely with xylazine (10 mg/kg) and sodium pentobarbital (50mg/kg; Cristália, Brazil) and injected with 1000 IU heparin (Cristália, Brazil). They were transcardially perfused through the left ventricle, using a peristaltic pump (Control Company, São Paulo, Brazil) with 100 mL of saline solution followed by 200 mL of fixative solution composed of 4% paraformaldehyde (PFA) (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.4 at room temperature. Brains were post-fixed in PFA at room temperature for 4 hours, kept in 30% sucrose in PBS for 3 days and then frozen in isopentane and liquid nitrogen. Coronal sections (20 µm) were obtained using a cryostat (Leica, Germany). Every 10th section (200 µm) was used for histological analysis, starting at +1.7 mm from Bregma and ending at -4.8 mm (C. L. MacLellan et al., 2006; Paxinos and Watson, 2007). Slices were stained with hematoxylin–eosin and the lesion volume was estimated using Scion Image J 4.0 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) as previously described (DeBow et al., 2003; MacLellan and Colbourne, 2005). For histological analysis were used three to five animals at each evaluated endpoint (24h, 72h and 7 days).

Biochemical analysis

Flow cytometry analysis

Striatum and sensorimotor cortex were dissociated with PBS and the cells were permeabilized with 0.1% PBS Triton X-100 for 10 min at room temperature and blocked for 15 min with 3% normal goat serum (Sigma-Aldrich - G9023). After blocking, cells were incubated with primary antibodies against neurons (anti-MAP2 rabbit - Sigma Aldrich – M9942), astrocytes (anti-GFAP rabbit - Sigma Aldrich – G9269), S100B positive cell (anti-S100B mouse - Sigma Aldrich - S2532), macrophage/microglia (anti-CD11b mouse Millipore – CBL1512) and apoptotic cells (anti-caspase-3 rabbit Cell signaling - 9661), at final concentration of 1:100 at room temperature for 2 h. The cells were washed twice with PBS and incubated for 1h with IgG antibody Alexa-fluor 633 anti-rabbit and Alexa-fluor 488 anti-mouse, at final concentration of 1:200. Negative controls (samples with the secondary antibody) were included for setting up the machine voltages and to determine the negative region of dot plot. The emission of fluorochromes was recorded through specific band-pass fluorescence filter: green (FL-1; 530 nm/30) and red (FL-4; 670 nm long pass). Fluorescence emissions were collected using logarithmic amplification. In brief, data from 10.000 events (intact cells) were acquired and the number of cells was determined after exclusion of debris events from data set. The number of cells in each quadrant was computed and the proportion of cells stained with GFAP, MAP2, CD11b, S100B and caspase 3, separately, were expressed as percentage of positive labeled cells (Heimfarth et al., 2012). All flow cytometric acquisitions and analyses were performed using FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and Flow Jo software (Weis et al., 2012). At each endpoint, were used a sample ranging from four to ten animals.

ELISA Assays

Protein was measured by Lowry's method, as modified by Peterson, using bovine serum albumin as a standard (Peterson, 1977). For Elisa assays, described below, were used a sample ranging from five to eight rats at each endpoint.

Brain tissue and CSF and serum samples

Rats were deeply anaesthetized as routinely (Xylazine and sodium pentobarbital) (10 and 50 mg/kg, i.p., respectively) and placed in a stereotaxic apparatus. Then, the cerebrospinal fluid CSF was obtained by puncture of the cisterna magna using an insulin syringe. A maximum volume of 30 μ L was collected over a 3-min period to minimize risk of brain stem damage. Serum samples of approximately 1mL of blood were obtained via cardiac puncture. Then, the samples were centrifuged and the supernatant removed. Serum and cerebrospinal fluid samples were frozen (-70 °C) until used for determination of immunocontent of S100B. For brain tissue samples, rats were decapitated and the brains removed; cortex and striatum were dissected on ice and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a Mcillwain Tissue Chopper.

Quantification of S100B

Slices were homogenized in PBS (50 mM NaCl, 18 mM Na₂HPO₄, 83 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4), containing 1 mM EGTA and 1 mM phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF). The S100B content in the CSF, serum and brain tissue were measured by ELISA, as described previously (Leite et al., 2008). Briefly, 50 μ l of sample plus 50 μ l of Tris buffer were incubated for 2hs on a microtiter plate that was previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.02 to 1 ng/ml. Results were expressed as ng/ μ l and ng/ μ g of protein, respectively.

Quantification of GFAP

Slices were homogenized in PBS (50 mM NaCl, 18 mM Na₂HPO₄, 83 mM NaH₂PO₄·H₂O, pH 7.4), containing 1 mM EGTA and 1 mM phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF). GFAP content was measured by ELISA, as described previously (Tramontina et al., 2007). GFAP assay was carried out by coating the samples with 100. μ L containing 70 μ g of protein for overnight at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 2hs was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1h, at room temperature. The color reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL. Results were expressed as ng/mg.

Statistical Analysis

One-way ANOVA was applied to determine the effects of ICH on behavioral tests, histological measurements, S100B and GFAP protein expression levels and percentage, MAP2, CD11b and caspase-3 percentage. Group differences were determined using Duncan *post hoc* tests. Analysis of covariance (ANCOVA) was used to evaluate the influence of S100B on behavioral, histological and biochemical parameters. All variables were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences were considered significant when $P \leq 0.05$ SPSS 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA) was used for data analysis.

Results

Behavioral changes after ICH

All ICH animals behaved as expected after surgery; including vigorous contralateral forelimb adduction, as well as spontaneous rotation towards the contralateral hemisphere when held by the tail (MacLellan et al., 2006; Mestriner et al., 2011; Rosenberg et al., 1990). Furthermore, these findings were in agreement with significant

1 motor dysfunction, assessed by behavioral tests at all endpoints (24h, 72h and 7 days post-
2 ICH), as follow.
3

4 *Neurological score*

5
6
7 As showed in Fig. 1A, all rats showed moderate to severe spontaneous ipsilateral
8 rotations and reduced beam walk ability at 24h, 72h and 7 days after ICH, indicating
9 sustained motor dysfunction ($F_{(3,41)}=269.79$ $P<0.0001$). However, the degree of
10 neurological impairment was higher in the earlier endpoints: 24h (6.57 ± 0.20) vs 72h
11 (5.71 ± 0.18) post-ICH $P\leq 0.05$; 24h (6.57 ± 0.20) vs 7 days (4.71 ± 0.18) post-ICH $P\leq 0.05$;
12 72h (5.71 ± 0.18) vs 7 days (4.71 ± 0.18) post-ICH $P\leq 0.05$. All injured groups were
13 different from control animals ($P\leq 0.05$).
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 *Grasping test*

24
25
26 Animals that underwent ICH surgery did not recover forelimb strength
27 ($F_{(3,41)}=44.63$; $P<0.0001$). Injured rats had a clear reduction as compared with control rats
28 ($1050.42\text{g} \pm 29.02$) at 24h post-ICH ($428.57\text{g}\pm 40.43$ $P\leq 0.05$), 72h post-ICH
29 ($633.81\text{g}\pm 55.77$ $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($675.28\text{g}\pm 65.05$ $P\leq 0.05$). Differences were
30 also found at 24h post-ICH ($428.57\text{g}\pm 40.43$ $P\leq 0.05$) compared to 72h ($633.81\text{g}\pm 55.77$
31 $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($675.28\text{g}\pm 65.05$ $P\leq 0.05$) (Fig. 1B).
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 *Asymmetrical forelimb use (cylinder test)*

42
43 Analysis of cylinder test data revealed significant impairment in contralateral
44 forelimb use after hemorrhagic lesion of left striatum ($F_{(3,41)}=36.32$ $P<0.0001$). There was
45 an evident asymmetry in forelimb use at 24h post-ICH ($25.00\%\pm 0.04$ $P\leq 0.05$), 72h post-
46 ICH ($23.71\%\pm 0.03$ $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($22.57\%\pm 0.03$ $P\leq 0.05$) as compared
47 with control animals ($49.70\%\pm 0.01$). No additional differences were found ($P>0.05$) (Fig.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

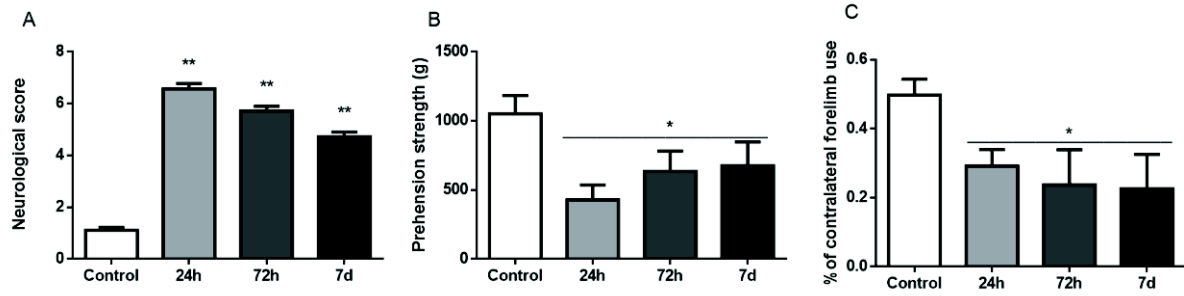


Figure 1. Behavioral effects of ICH at different post-lesion timepoints in ipsilesional striatum on neurological score (A) grasping test (B) and cylinder test (C). Data are expressed as mean \pm SE. * Different from non-lesion group and ** different from all endpoints, $P \leq 0.05$ (One-Way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test).

Volume of ICH injury

Collagenase injection into dorsolateral striatum produced a significant brain injury (Fig. 2A), evidenced by lesion volume ($F_{(3,23)}=26.94$ $P < 0.0001$). At 24h post-ICH, the hematoma and edema compressed the adjacent parenchyma leading to an apparently increased volume of the damaged hemisphere (Fig. 2B). We evidenced a reduction in lesion volume at 7 days post-ICH ($24.14\text{mm}^3 \pm 5.47$) in comparison to 24h post-ICH ($62.69\text{mm}^3 \pm 2.57$ $P \leq 0.05$) and 72h post-ICH ($40.36\text{mm}^3 \pm 11.59$ $P \leq 0.05$) groups. These findings suggest a reduction of hematoma and edema during the progression of ICH. Moreover, all injured rats were different from control animals ($P \leq 0.05$).

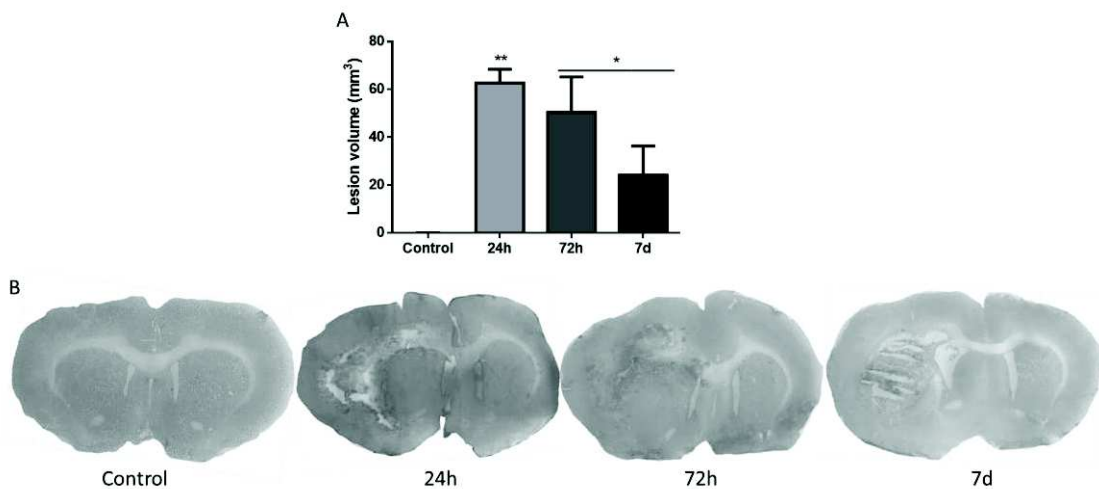


Figure 2. Injury volume after ICH at different post-lesion time points in ipsilesional striatum (A) representative image of ICH progression (B). Data are expressed as mean \pm SE. * Different from control group and ** different from control and post-ICH groups, $P \leq 0.05$ (One-Way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test).

S100B secretion during ICH development

One way ANOVA demonstrated a significant main effect of ICH on S100B content in serum ($F_{(4,29)}=20.80$ $P<0.0001$) and CSF ($F_{(4,31)}=11.24$ $P<0.0001$). *Pos hoc* analysis showed significant increase in S100B serum levels 6h post-ICH ($6.12\text{ng}/\mu\text{l}\pm 0.90$ $P\leq 0.05$) related to control animals ($2.74\text{ng}/\mu\text{l}\pm 0.47$), 24h ($0.91\text{ng}/\mu\text{l}\pm 0.12$ $P\leq 0.05$), 72h ($1.21\text{ng}/\mu\text{l}\pm 0.24$ $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($1.00\text{ng}/\mu\text{l}\pm 0.13$ $P\leq 0.05$) (Fig. 3A). Similarly, analysis of *pos hoc* Duncan test showed significant increase in S100B CSF levels 6h post-ICH ($127.36\text{ng}/\mu\text{l}\pm 22.75$ $P\leq 0.05$) related to non-injured animals ($28.80\text{ng}/\mu\text{l}\pm 14.10$), 24h ($52.23\text{ng}/\mu\text{l}\pm 8.02$ $P\leq 0.05$), 72h ($24.86\text{ng}/\mu\text{l}\pm 4.69$ $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($31.18\text{ng}/\mu\text{l}\pm 4.54$ $P\leq 0.05$) (Fig. 3B).

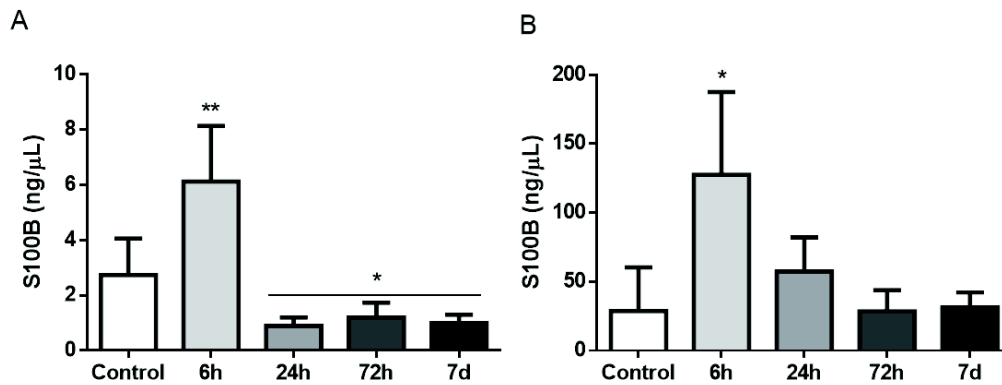


Figure 3. S100B expression on ICH in different post-lesion time points in ipsilesional striatum in serum (A) CSF (B). Data are expressed as mean \pm SE. * Different from control group and ** different from all groups, $P\leq 0.05$ (One-Way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test).

Cellular responses

S100B Content after ICH

Striatum. One way ANOVA of S100B expression in striatum showed significant main effect on ICH injury ($F_{(4,35)}=5.15$ $P<0.005$). *Post hoc* test revealed increase S100B expression 7 days post-ICH ($1.34\pm 0.25\text{ng}/\mu\text{g}$ $P\leq 0.05$) compared to control group ($0.87\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.13$), 6h ($0.65\text{ng}/\mu\text{g}\pm 0.11$ $P\leq 0.05$), 24h ($0.86\text{ng}/\mu\text{g}\pm 0.15$ $P\leq 0.05$) and 72h post-ICH ($0.43\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.04$ $P\leq 0.05$) (Fig. 4A).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Cortex. One way ANOVA of S100B on cortex showed significant differences between groups ($F_{(4,36)}=3.28$ $P<0.05$). However, Duncan's test revealed significant difference 6h post-ICH ($0.90\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.20$) compared to control animals ($0.54\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.04$ $P\leq 0.05$), 24h ($0.46\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.05$ $P\leq 0.05$), 72h ($0.52\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.05$ $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($0.59\text{ng}/\mu\text{g} \pm 0.06$ $P\leq 0.05$) (Fig. 4B).

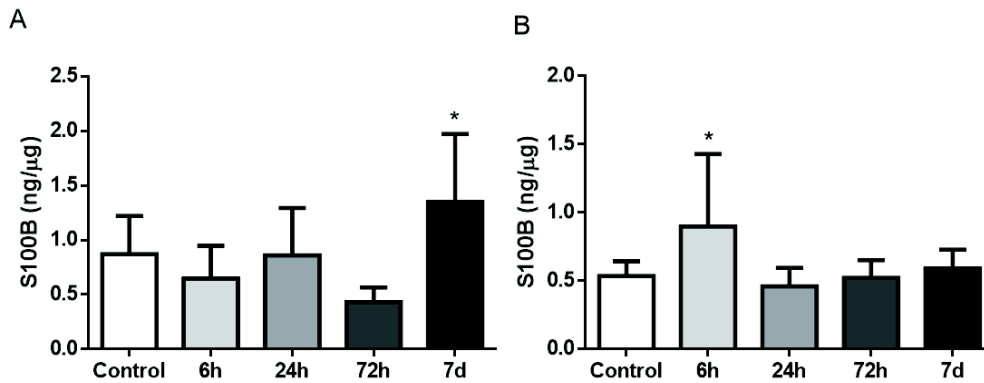


Figure 4. S100B expression on ICH in different post-lesion time points in ipsilesional striatum (A) and cortex (B). Data are expressed as mean \pm SE. * Different from control group, $P\leq 0.05$ (One-Way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test).

GFAP content after ICH

Striatum. One way ANOVA revealed a significant main effect of ICH in GFAP expression on striatum ($F_{(4,32)}=4.77$ $P\leq 0.005$). The *post hoc* test demonstrated significant increase 7 days post-ICH ($45.32\text{ng}/\text{mg} \pm 14.11$ $P\leq 0.05$) versus control group ($19.67\text{ng}/\text{mg} \pm 3.01$), 6h ($15.67\text{ng}/\text{mg} \pm 4.43$ $P\leq 0.05$), 24h ($10.64\text{ng}/\text{mg} \pm 1.39$ $P\leq 0.05$) and 72h post-ICH ($28.36\text{ng}/\text{mg} \pm 4.65$ $P\leq 0.05$), demonstrating a late reactive astrocytosis (Fig. 5A).

Cortex. One way ANOVA presented significant main effects between groups in GFAP expression on cortex ($F_{(4,31)}=6.89$ $P\leq 0.001$). Similarly, a prominent increase at 7 days post-ICH ($40.52\text{ng}/\text{mg} \pm 7.93$ $P\leq 0.05$) compared to control animals ($19.12\text{ng}/\text{mg} \pm 1.81$), 6h ($18.43\text{ng}/\text{mg} \pm 4.72$ $P\leq 0.05$) and 24h post-ICH ($7.00\text{ng}/\text{mg} \pm 1.03$ $P\leq 0.05$) was observed in cortex. Although, at 24h post-ICH ($7.00\text{ng}/\text{mg} \pm 1.03$ $P\leq 0.05$), GFAP proved

reduced compared to late time points (72h post-ICH: 28.87ng/mg±3.31 $P\leq 0.05$ and 7 days post-ICH: 40.52ng/mg±7.93 $P\leq 0.05$) (Fig. 5B).

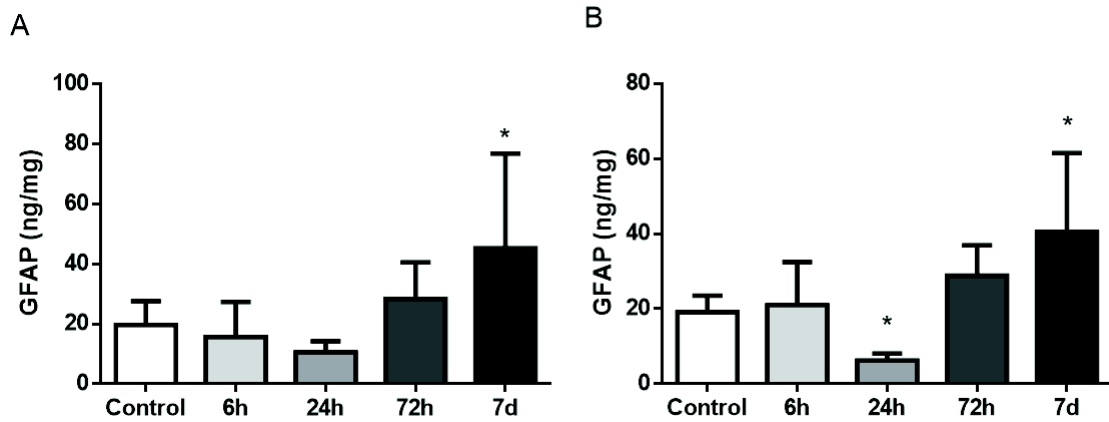


Figure 5. GFAP expression on ICH in different post-lesion time point in ipsilesional striatum (A) and cortex (B). Data are expressed as mean ± SE. * Different from control group, $P\leq 0.05$ (One-Way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test).

Quantification of neuronal and glial cells in striatum

Neurons. As observed in fig. 6A, the percentage of neurons (MAP2-positive) were significantly reduced ($F_{(4,31)}=30.98$ $P<0.0001$) at 6h (1,15%±0.10 $P\leq 0.05$), 24h (3.95%±0.45 $P\leq 0.05$), 72h (4.67%±0.26 $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH (3.90%±0.41 $P\leq 0.05$) in comparison with control animals (7.73%±0.90 $P\leq 0.05$). Additional differences was seen at 6h post-ICH compared to 24h ($P\leq 0.05$), 72h ($P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($P\leq 0.05$), suggesting an augmented sensitization of neurons 6h post-ICH due to lesion and blood degradation effects.

Astrocytes. One way ANOVA demonstrated a significant main effect of ICH injury on GFAP ($F_{(4,34)}=214.15$ $P<0.0001$). Additionally, *post hoc* Duncan test in striatum revealed an increased percentage of astrocytes cells at 24h (2.76%±0.13 $P\leq 0.05$), 72h post-ICH (4.98%±0.12 $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH (4.94%±0.36 $P\leq 0.05$) compared to control animals (0.85%±0.06) and 6h post-ICH (0.65±0.06). Additional differences were seen between 24h post-ICH versus 72h post-ICH and 7 days post-ICH ($P\leq 0.05$) (Fig. 6B).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Microphages/microglia. Analysis of microglia/macrophage responses stained with CD11b+ in striatum, demonstrated a significant main effect of ICH injury ($F_{(4,33)}=8.60$ $P<0.0001$). *Post hoc* Duncan test showed an increased microphage/microglial cells at 6h ($5.10\%\pm 0.47$ $P\leq 0.05$), 24h ($5.56\%\pm 0.69$ $P\leq 0.05$) and 72h ($5.79\%\pm 0.47$ $P\leq 0.05$), peaking at 7 days post-ICH ($7.72\%\pm 0.38$ $P\leq 0.05$) compared to control group ($3.32\%\pm 0.43$). Additional differences were found at 7 days post-ICH compared to 6h, 24h and 72h post-ICH ($P\leq 0.05$) (Fig. 6C).

Apoptotic cells. Analysis from flow cytometry by caspase-3 positive cells in striatum revealed a progressive increment in the percentage of apoptosis from 24h post-ICH ($F_{(4,33)}=21.35$ $P<0.0001$), as viewed in fig. 6D. *Post hoc* test revealed differences between control animals ($0.25\%\pm 0.09$) and other endpoints: 24h post-ICH ($1.67\%\pm 0.10$ $P\leq 0.05$), 72h post-ICH ($1.73\%\pm 0.20$ $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($2.19\%\pm 0.46$ $P\leq 0.05$) which is compatible with damage development.

S100B+ cell. Effect of ICH on S100B positive cells in striatum was also observed ($F_{(4,34)}=11.82$ $P<0.0001$). *Post hoc* Duncan analysis revealed a pronounced increase 24h post-ICH ($4.57\%\pm 0.63$ $P\leq 0.05$), 72h post-ICH ($3.62\%\pm 0.36$ $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($5.48\%\pm 0.92$ $P\leq 0.05$) compared to control animals ($1.72\%\pm 0.78$) and 6h post-ICH ($0.68\%\pm 0.08$) (Fig. 6E).

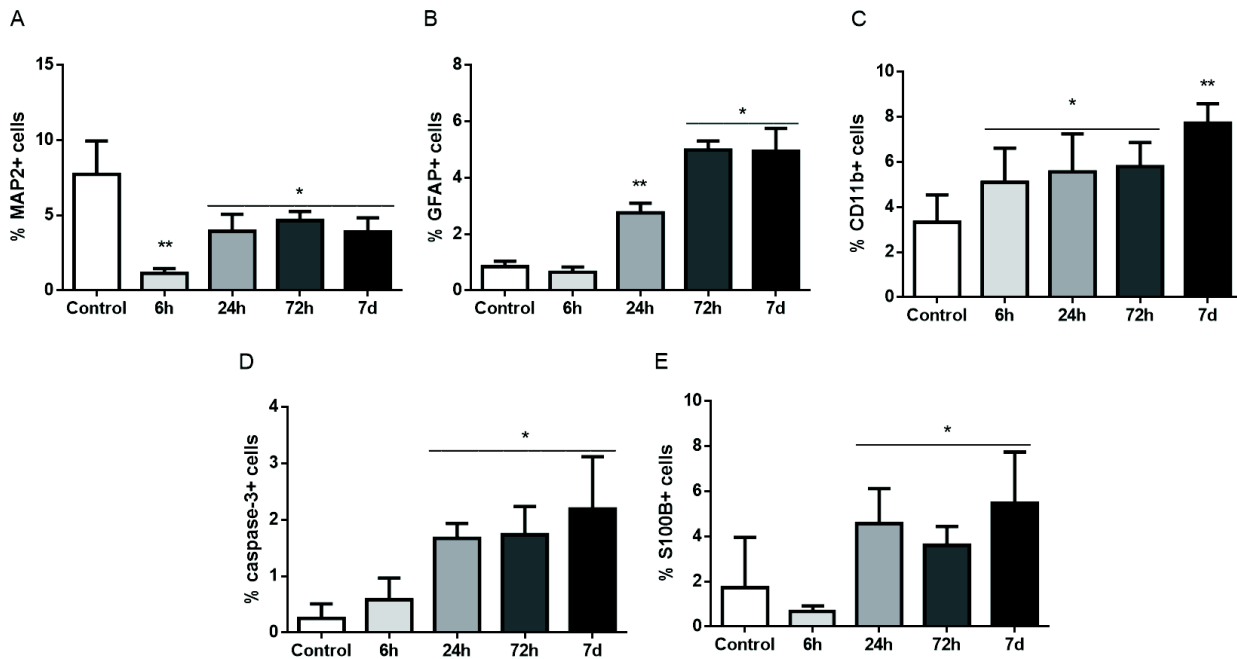


Figure 6. Percentage of astrocytic (a), neuronal (b) microglial (c) apoptotic (d) and S100B+ cells (e) on ICH in different post-lesion time point in ipsilesional striatum. Data are expressed as mean \pm SE. * Different from control group and ** different from all groups, $P \leq 0.05$ (One-Way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test).

Quantification of glial cells in cortex

Astrocyte. As observed in fig. 7A, one way ANOVA demonstrate a significant effect of ICH injury on percentage of astrocyte cells in cortex ($F_{(4,35)}=31.04$ $P < 0.0001$). *Post hoc* test revealed a pronounced increase of astrocyte cells 7 days post-ICH ($4.59\% \pm 0.25$ $P \leq 0.05$) compared to control animals ($2.71\% \pm 0.27$ $P \leq 0.05$), 6h ($1.08\% \pm 0.12$ $P \leq 0.05$), 24h ($2.33\% \pm 0.36$ $P \leq 0.05$) and 72h post-ICH ($2.63\% \pm 0.10$ $P \leq 0.05$). Additional differences was observed between 6h post-ICH versus 24h ($P \leq 0.05$) and 72h post-ICH ($P \leq 0.05$).

Macrophages/microglia. A significant main effect of ICH injury was also revealed in microglial/ macrophage cells ($F_{(4,35)}=17.54$ $P < 0.0001$). *Post hoc* Duncan test demonstrated a pronounced increase on percentage of microphage/microglial cells at 6h post-ICH ($17.53\% \pm 1.89$ $P \leq 0.05$) versus control animals ($10.78\% \pm 0.77$), 24h post-ICH ($3.39\% \pm 0.27$ $P \leq 0.05$), 72h post-ICH ($6.99\% \pm 0.70$ $P \leq 0.05$) and 7 days post-ICH

(8.85%±0.78 $P\leq 0.05$). Moreover, a significant reduction on 24h post-ICH (3.39%±0.27 $P\leq 0.05$) were evident compared to control animals ($P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH ($P\leq 0.05$) (Fig. 7B).

S100B+ cells. Like observed in fig. 7C, was demonstrated a significant main effect of injury on S100B positive cells ($F_{(4,33)}=54.40$ $P<0.0001$). Furthermore, *post hoc* Duncan test displayed a profile with increased elevation at 24h (2.70%±0.31 $P\leq 0.05$), 72h post-ICH (3.94%±0.09 $P\leq 0.05$) and 7 days post-ICH (5.60%±0.42 $P\leq 0.05$) compared to control group (1.62%±0.13) and 6h post-ICH (1.32%±0.17).

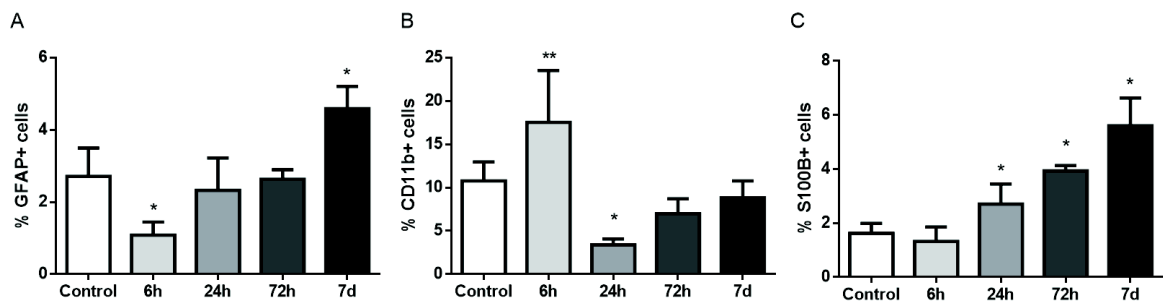


Figure 7. Percentage of astrocytic (a), microglial (b) and S100B+ cells (c) on ICH in different post-lesion time points in ipsilesional cortex. Data are expressed as mean ± SE. * Different from control group and ** different from all endpoints, $P\leq 0.05$ (One-Way ANOVA followed by Duncan *post hoc* test).

S100B influence on behavioral and biochemical data

Interestingly, our results demonstrate a series of influences of S100B on different parameters evaluated by analysis of covariance (ANCOVA) as a multiple regression model. These S100B interference may be modulated by an interaction between cortico-striatal pathway (Table 1). The results exhibit the expression of cortical S100B probably influencing the levels of S100B in serum ($F_{(1,29)}=11.46$; $P<0.005$). Furthermore, S100B secretion on serum influences the percentage of macrophage/microglial cells in cortex ($F_{(1,29)}=4.29$ $P<0.05$).

At the same time, the percentage of S100B positive cells in striatum, likewise evidenced to affect the percentage of macrophage/microglial cells in same area

($F_{(1,33)}=6.27$ $P<0.05$). Additionally, the percentage of S100B positive cells in cortex exhibits an interference in GFAP expression in the same brain area ($F_{(1,26)}=7.74$ $P<0.05$) suggesting an S100B role on reactive astrocytosis.

The expression of S100B in striatum, however, showed influence the percentage of S100B positive cells in cortex ($F_{(1,29)}=6.53$ $P<0.05$), revealing a significant interaction between cortex and striatum.

Furthermore, S100B expression in striatum negatively influenced the behavioral outcome on grasping test ($F_{(1,26)}=12,05$ $P<0.005$). Similarly, S100B expression in cortex were negatively related with functional pattern, assessed by cylinder test ($F_{(1,27)}=5.21$ $P<0.05$). Overall, there is an evidence that S100B protein acts on macrophage/microglial activation and reactive astrocytosis modulation after ICH. This role could contribute to damage progression and neurological impairment, as we observed in the current study.

| | Intervienience test among variables under study - ANCOVA | | | | | | |
|------------------|--|-----------------|------------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| | S100B Serum | GFAP Cortex | % CD11b Striatum | % CD11b Cortex | % S100B Cortex | Grasping test | Cylinder test |
| S100B Serum | NS | NS | NS | P < 0.05 | NS | NS | NS |
| S100B Cortex | P < 0.005 | NS | NS | NS | NS | NS | P < 0.05 |
| S100B Striatum | NS | NS | NS | NS | P ≤ 0.01 | P < 0.005 | NS |
| % S100B Cortex | NS | P ≤ 0.01 | NS | NS | NS | NS | NS |
| % S100B Striatum | NS | NS | P ≤ 0.01 | NS | NS | NS | NS |

Table 1. S100B interactions with behavioral and biochemical results.

Discussion

1
2 It is reported, for the first time, a time-related profile of S100B after experimental
3 ICH (6h, 24h, 72h and 7 days post-ICH). This protein is a strong candidate to influence
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

It is reported, for the first time, a time-related profile of S100B after experimental ICH (6h, 24h, 72h and 7 days post-ICH). This protein is a strong candidate to influence macrophage/microglial and astrocyte cells after ICH, contributing to behavioral deficits. A number of studies report that extracellular S100B is implicated in the pathophysiology of brain disorders by affecting astrocytes and microglial function (Adami et al., 2001; Hofmann et al., 1999; Villarreal et al., 2014; Yan et al., 1996). In astrocytes, S100B has been shown to induce proliferation (Selinfreund et al., 1991), increase inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, nitric oxide release, interleukin 1-beta (IL-1 β), interleukin 6 and TNF- α secretion (de Souza et al., 2013; Hu and Van Eldik, 1999, 1996; Ponath et al., 2007). Similarly, in microglia, S100B has been shown to induce pro-inflammatory mediators and cell migration (Bianchi et al., 2011, 2010, 2007). These observations suggest that S100B could participate in brain inflammatory response intervening in brain injuries through astrocyte and microglia activation. These related responses attributed to S100B, likewise, seems to occur in ICH.

66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

In the present work, is observed an acute increase secretion of S100B in CSF and serum (6h post-ICH), suggesting this protein could be secreted by activated glial cells, leading to high levels of this protein in the extracellular space contributing to neuronal survival and/or death. Several studies have shown S100B is early detectable in CSF and serum after different brain damage reflecting blood-brain-barrier dysfunction and neuronal damage. S100B high concentration also reach the bloodstream contributing to increase the neurological impairment (Marchi et al., 2003; Michetti et al., 2012; Rothermundt et al., 2003). In agreement, the transient elevation of S100B in serum 6hs after ICH induction significantly correlates with brain edema progression and severity of hematoma volume (Tanaka et al., 2009). Clinically, the levels of CSF and serum of S100B

1 after spontaneous onset of ICH seems to be related with functional outcome. It is largely
2 known that increases in peripheral S100B reflect brain injury and serum S100B levels
3 may be useful as a biomarker for evaluating the prognosis of ICH (Huang et al., 2010),
4 which is in accordance with our study. On the other hand, at nanomolar concentrations,
5 S100B likewise, act as neuroprotective and neurotrophic factor (Huttunen et al., 2000;
6 Kleindienst et al., 2007, 2005; Rickmann et al., 1995) in an attempt to reorganize the
7 damage microenvironment.
8

9
10
11
12
13
14
15
16
17 Interestingly, it was observed that acute increase of the levels of S100B in serum
18 at 6 hours post-ICH may influence on later S100B expression and early
19 macrophage/microglial density, both in cerebral cortex, however, the reason for this
20 relationship is not completely understood. A possibility is focused on thrombin levels
21 after ICH. A previous study has shown thrombin, released from hematoma, induce the
22 up-regulation of S100B and excitotoxicity (Shirakawa, 2012). Additionally, were shown
23 S100B could act as a regulator of microglial cell functions and, indirectly, in the
24 inflammatory response after injury. Acting as an intracellular regulator and an
25 extracellular signal, S100B might control astrocytic, neuronal and microglial activities,
26 in part, via engagement of receptor for advanced glycation end products (RAGE)
27 (Donato, 2001; Van Eldik and Wainwright, 2003). Binding to RAGE, S100B in microglia
28 causes nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation resulting in up-regulation of COX-2
29 (Shanmugam et al., 2003), a key enzyme in the inflammatory response (Minghetti, 2004).
30 From this standpoint, S100B in cortex and in striatum seems to contribute acutely to
31 initiate and perpetuate immune responses linked to microglia and inflammation.
32

33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53 S100B positive cells demonstrate to influence GFAP expression in cortex at 7
54 days post-ICH, suggesting S100B can induce an astroglial reactive phenotype. In
55 astrocytes, recombinant S100B have been shown to induce proliferation (Selinfreund et
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

al., 1991), astrocytic stellation, facilitate the astroglial invasion of an artificial wound thus, being able to induce morphological features of reactive astrocytes (Villarreal et al., 2014).

This is the first study showing that S100B in striatum could influence negatively in forelimb strength, as observed at all assessed endpoints. Similarly, S100B in cortex could affect the gross motor ability of contralateral forelimb producing an evident asymmetry in all analyzed endpoints. A number of pathological states and neurodegenerative diseases induces S100B release from astrocytes and increased S100B levels are found in CSF and serum (Rothermundt et al., 2003), which is in accordance with our study. The association between S100B and the motor deficits thus, seems to be feasible.

Taking together, the presented results suggest S100B could participate in neural survival and death, increasing microglia recruitment and modulating reactive astrogliosis and probably the glial scar formation. These altered responses appear to be modulated by an interaction between cortex and striatum configuring a feedforward loop mediated by S100B promoting deleterious effects in ICH. Thus, here is exposed a temporal relationship of S100B on local brain injury environment influencing directly or indirectly the functional changes related to ICH.

The major advance contained in this study is that S100B influence on the progression of ICH could behaving as an alarming signal and regulator of astrocytic and microglial cells, perpetuating, thus, the inflammatory response and neuronal death. Summing our present findings with the literature, it is evidenced the need to invest in studies targeting S100B. However, future studies are needed to better understand the role of S100B in HIC.

Conclusions

The present study shows that S100B is useful as an ICH-damage biomarker but its importance is not limited to that. Here we show that this protein as a significant component of the ICH lesion, influencing astrocytic and microglial responses, contribute with the functional impairments.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

- Adami, C., Sorci, G., Blasi, E., Agneletti, A.L., Bistoni, F., Donato, R., 2001. S100B expression in and effects on microglia. *Glia* 33, 131–142.
- Altumbabic, M., Peeling, J., Del Bigio, M.R., 1998. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration. *Stroke* 29, 1917–1922.
- Andres, R.H., Guzman, R., Ducray, A.D., Mordasini, P., Gera, A., Barth, A., Widmer, H.R., Steinberg, G.K., 2008. Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage. *Neurosurg. Focus* 24, 1 – 10.
- Bianchi, R., Adami, C., Giambanco, I., Donato, R., 2007. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J. Leukoc. Biol.* 81, 108–118.
- Bianchi, R., Giambanco, I., Donato, R., 2010. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1. Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α . *Neurobiol. Aging* 31, 665–677.
- Bianchi, R., Kastrisianaki, E., Giambanco, I., Donato, R., 2011. S100B protein stimulates microglia migration via rage-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *J. Biol. Chem.* 286, 7214–7226.
- Broderick, J., Connolly, S., Feldmann, E., Hanley, D., Kase, C., Krieger, D., Mayberg, M., Morgenstern, L., Ogilvy, C.S., Vespa, P., Zuccarello, M., 2007. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage in Adults. *Stroke* 38, 2001–2023.
- Cabe, P. a, Tilson, H. a, Mitchell, C.L., Dennis, R., 1978. A simple recording grip strength device. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 8, 101–102.
- Davey, G., Murmann, P., Heizmann, C., 2001. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 276, 30819 – 30826.
- De Souza, D.F., Wartchow, K., Hansen, F., Lunardi, P., Guerra, M.C., Nardin, P., Gonçalves, C.A., 2013. Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 43, 14–22.
- DeBow, S.B., Davies, M.L.A., Clarke, H.L., Colbourne, F., 2003. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. *Stroke* 34, 1021–1026.
- Donato, R., 2007. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* 7, 711–724.

- 1 Donato, R., 2001. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-
2 hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell*
3 *Biol.* 33, 637 - 668.
- 4
5 Ellis, E.F., Willoughby, K. a., Sparks, S. a., Chen, T., 2007. S100B protein is released
6 from rat neonatal neurons, astrocytes, and microglia by in vitro trauma and anti-S100
7 increases trauma-induced delayed neuronal injury and negates the protective effect
8 of exogenous S100B on neurons. *J. Neurochem.* 101, 1463–1470.
- 9
10 Fiorella, D., Zuckerman, S.L., Khan, I.S., Ganesh, N.K., Mocco, J., 2015. Intracerebral
11 Hemorrhage: a common and devastating disease in need of better treatment. *World*
12 *Neurosurg.* 1–6.
- 13
14
15 Gerlach, R., Demel, G., König, H.G., Gross, U., Prehn, J.H.M., Raabe, A., Seifert, V.,
16 Kögel, D., 2006. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress.
17 *Neuroscience* 141, 1697–1701.
- 18
19
20 Hayakawa, K., Qiu, J., Lo, E.H., 2010. Biphasic actions of HMGB1 signaling in
21 inflammation and recovery after stroke. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1207, 50 - 57.
- 22
23
24 Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Dutra, M.F., Andrade, C., Pettenuzzo, L., Guma, F.T.C.R.,
25 Gonçalves, C.A.S., da Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2012. In vivo treatment
26 with diphenyl ditelluride induces neurodegeneration in striatum of young rats:
27 Implications of MAPK and Akt pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 143–152.
- 28
29
30 Heizmann, C.W., 1999. Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system.
31 *Neurochem. Res.* 24, 1097–1100.
- 32
33
34 Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N.,
35 Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M.F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J.,
36 Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., Schmidt, A.M., 1999. RAGE mediates a novel
37 proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin
38 polypeptides. *Cell* 97, 889–901.
- 39
40
41 Hu, J., Van Eldik, L.J., 1999. Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and
42 enhance beta amyloid-induced glial activation. *Brain Res.* 842, 46–54.
- 43
44
45 Hu, J., Van Eldik, L.J., 1996. S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes
46 via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1313, 239–245.
- 47
48
49 Huang, M., Dong, X.-Q., Hu, Y.-Y., Yu, W.-H., Zhang, Z.-Y., 2010. High S100B levels
50 in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with acute basal ganglia
51 hemorrhage are associated with poor outcome. *World J Emerg Med* 1, 22 – 31.
- 52
53
54 Huttunen, H., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A., 2000. Coregulation of neurite
55 outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through RAGE
56 activation. *J Biol Chem.* 275, 40096-40105.
- 57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Imamura, N., Hida, H., Aihara, N., Ishida, K., Kanda, Y., Nishino, H., Yamada, K., 2003. Neurodegeneration of substantia nigra accompanied with macrophage/microglia infiltration after intrastriatal hemorrhage. *Neurosci. Res.* 46, 289–298.
- Jeyasingham, R.A., Baird, A.L., Meldrum, A., Dunnett, S.B., 2001. Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. *Brain Res. Bull.* 55, 541–548.
- Kleindienst, A., Hesse, F., Bullock, M.R., Buchfelder, M., 2007. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog. Brain Res.* 161, 317–325.
- Kleindienst, A., McGinn, M.J., Harvey, H.B., Colello, R.J., Hamm, R.J., Bullock, M.R., 2005. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 22, 645–655.
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99.
- Lynch, J.R., Robert Blessing, White, W.D., Grocott, H.P., Newman, M.F., Laskowitz, D.T., 2004. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke.* 35, 57 - 63.
- MacLellan, C., Gyawali, S., Colbourne, F., 2006. Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behav. Brain Res.* 175, 82–89.
- MacLellan, C.L., Auriat, A.M., McGie, S.C., Yan, R.H.Y., Huynh, H.D., De Butte, M.F., Colbourne, F., 2006. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 1031–1042.
- MacLellan, C.L., Colbourne, F., 2005. Mild to moderate hyperthermia does not worsen outcome after severe intracerebral hemorrhage in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 1020–1029.
- MacLellan, C.L., Silasi, G., Poon, C.C., Edmundson, C.L., Buist, R., Peeling, J., Colbourne, F., 2008. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 516–525.
- Maki, T., Hayakawa, K., Pham, L.-D.D., Xing, C., Lo, E.H., Arai, K., 2013. Biphasic mechanisms of neurovascular unit injury and protection in CNS diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 12, 302–15.
- Marchi, N., Fazio, V., Cucullo, L., Kight, K., Masaryk, T., Barnett, G., Vogelbaum, M., Kinter, M., Rasmussen, P., Mayberg, M.R., Janigro, D., 2003. Serum transthyretin monomer as a possible marker of blood-to-CSF barrier disruption., *The Journal of neuroscience.* 23, 1949 - 1955.

- 1 Mayer, S.A., Rincon, F., 2005. Treatment of intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol.*
2 4, 662 - 672.
- 3 Mestriner, R.G., Pagnussat, a. S., Boisserand, L.S.B., Valentim, L., Netto, C. a., 2011.
4 Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor
5 recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp. Neurol.* 227, 53–
6 61.
- 7
8
9 Michetti, F., Corvino, V., Geloso, M.C., Lattanzi, W., Bernardini, C., Serpero, L.,
10 Gazzolo, D., 2012. The S100B protein in biological fluids: More than a lifelong
11 biomarker of brain distress. *J. Neurochem.* 120, 644 - 659.
- 12
13
14 Minghetti, L., 2004. Role of COX-2 in inflammatory and degenerative brain diseases.
15 *Subcell. Biochem.* 42, 127–141.
- 16
17
18 Paxinos, G., Watson, C., 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Ed. San Diego,
19 Elsevier. Academic Press.
- 20
21
22 Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which
23 is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- 24
25
26 Pinto, S.S., Gottfried, C., Mendez, A., Gonçalves, D., Karl, J., Gonçalves, C. a., Wofchuk,
27 S., Rodnight, R., 2000. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures
28 from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* 486, 203–207.
- 29
30
31 Ponath, G., Schettler, C., Kaestner, F., Voigt, B., Wentker, D., Arolt, V., Rothermundt,
32 M., 2007. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J.*
33 *Neuroimmunol.* 184, 214–222.
- 34
35
36 Rickmann, M., Wolff, J.R., Meyer, D.L., 1995. Expression of S100 protein in the
37 vestibular nuclei during compensation of unilateral labyrinthectomy symptoms.
38 *Brain Res.* 688, 8–14.
- 39
40
41 Rosenberg, G., Mun-Bryce, S., Wesley, M., Kornfeld, M., 1990. Collagenase-induced
42 intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 21, 801–807.
- 43
44
45 Rosenberg, G.A., Mun-Bryce, S., Wesley, M., Kornfeld, M., 1990. Collagenase-induced
46 intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke.* 21, 801–807.
- 47
48
49 Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H.M., Arolt, V., 2003. S100B in brain damage and
50 neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60, 614–632.
- 51
52
53 Sangha, N., Gonzales, N.R., 2011. Treatment Targets in Intracerebral Hemorrhage.
54 *Neurotherapeutics* 8, 374–387.
- 55
56
57 Schallert, T., 2006. Behavioral Tests for Preclinical Intervention Assessment. *NeuroRx*
58 3, 497–504.
- 59
60
61
62
63
64
65

- 1 Selinfreund, R.H., Barger, S.W., Pledger, W.J., Van Eldik, L.J., 1991. Neurotrophic
2 protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
3 88, 3554–3558.
- 4 Shanmugam, N., Kim, Y.S., Lanting, L., Natarajan, R., 2003. Regulation of
5 cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced
6 glycation end products. *J. Biol. Chem.* 278, 34834–34844.
- 7
8
9 Shirakawa, H., 2012. Pathophysiological Significance of Canonical Transient Receptor
10 Potential (TRPC) Subfamily in Astrocyte Activation. *Yakugaku Zasshi.* 132, 587 -
11 593.
- 12
13
14 Sorci, G., Donato, R., Bianchi, R., Riuzzi, F., Tubaro, C., Arcuri, C., Giambanco, I., 2010.
15 S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart,
16 and beyond. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 1 - 13.
- 17
18
19 Szymanska, A., Biernaskie, J., Laidley, D., Granter-Button, S., Corbett, D., 2006.
20 Minocycline and intracerebral hemorrhage: Influence of injury severity and delay to
21 treatment. *Exp. Neurol.* 197, 189–196.
- 22
23
24 Tanaka, Y., Marumo, T., Shibuta, H., Omura, T., Yoshida, S., 2009. Serum S100B, brain
25 edema, and hematoma formation in a rat model of collagenase-induced hemorrhagic
26 stroke. *Brain Res. Bull.* 78, 158–163.
- 27
28
29 Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P.,
30 Andrezza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Goncalves, C.A., 2007.
31 Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its
32 phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 162, 282–286.
- 33
34
35 Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B:
36 beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* 21, 97–
37 108.
- 38
39
40 Villarreal, A., Seoane, R., González Torres, A., Rosciszewski, G., Angelo, M.F., Rossi,
41 A., Barker, P. a, Ramos, A.J., 2014. S100B protein activates a RAGE-dependent
42 autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive
43 gliosis. *J. Neurochem.* 131, 190 – 205.
- 44
45
46 Weis, S.N., Pettenuzzo, L.F., Krolow, R., Valentim, L.M., Mota, C.S., Dalmaz, C., Wyse,
47 A.T.S., Netto, C.A., 2012. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes
48 in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 12, 271–279.
- 49
50
51 Worthmann, H., Tryc, a. B., Goldbecker, a., Ma, Y.T., Tountopoulou, a., Hahn, a.,
52 Dengler, R., Lichtinghagen, R., Weissenborn, K., 2010. The temporal profile of
53 inflammatory markers and mediators in blood after acute ischemic stroke differs
54 depending on stroke outcome. *Cerebrovasc. Dis.* 30, 85–92.
- 55
56
57 Yan, S., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima,
58 M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A., AM., 1996. RAGE
59 and amyloid-b peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382, 685–691.
- 60
61
62
63
64
65