

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENVELHECIMENTO HUMANO

**Avaliação do potencial neuroprotetor da *Spirulina platensis* em
modelo de hemorragia intracerebral experimental**

Timóteo Abrantes de Lacerda Almeida

Passo Fundo

2016

Timóteo Abrantes de Lacerda Almeida

Avaliação do potencial neuroprotetor da *Spirulina platensis* em modelo de hemorragia intracerebral experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Envelhecimento Humano.

Orientador:

Profa. Dra. Telma Elita Bertolin

Coorientador:

Prof. Dr. Ricardo Macedo Camelo

Passo Fundo

2016

CIP – Catalogação na Publicação

A447h Almeida, Timóteo Abrantes de Lacerda
Avaliação do potencial neuroprotetor da *Spirulina platensis*
em modelo de hemorragia intracerebral experimental / Timóteo
Abrantes de Lacerda Almeida. – 2016.
44 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) –
Universidade de Passo Fundo, 2016.
Orientadora: Profa. Dra. Telma Elita Bertolin.
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Macedo Camelo.

1. Hemorragia. 2. Acidentes vasculares cerebrais. 3. Neurologia.
I. Bertolin, Telma Elita, orientadora. III. Camelo, Ricardo Macedo,
coorientador. IV. Título.

CDU: 613.98
616.8

Catalogação: Bibliotecária Cristina Troller - CRB 10/1430

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



PPGEH

Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano
Faculdade de Educação Física e Fisioterapia - FEFF

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação:

"Avaliação do potencial neuroprotetor da *Spirulina platensis* em modelo de hemorragia intracerebral experimental"

Elaborada por

TIMÓTEO ABRANTES DE LACERDA ALMEIDA

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Mestre em Envelhecimento Humano"

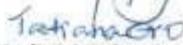
Aprovado em: 01/04/2016
Pela Banca Examinadora


Prof. Dr. Telma Elita Bertolin
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora


Prof. Dr. Ricardo Macedo Carneiro
Coordenador - Universidade Federal de Alagoas - UFAL


Prof. Dr. Adriano Pasqualotti
Universidade de Passo Fundo - UPF/PPGEH


Prof. Dr. Cassiano Mateus Forcelini
Universidade de Passo Fundo - UPF/FEFF


Prof. Dr. Tatiana Oro
Universidade de Passo Fundo - UPF/PPGCTA

DEDICATÓRIA

À minha esposa Fernanda.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio incansável e incentivo constante para avançar sempre na minha formação acadêmica, pelo exemplo de amor, humildade e justiça.

À minha esposa Fernanda, companheira da vida e do mestrado, que ao longo dos anos tem sido meu porto seguro e lugar de descanso.

Aos meus tios, Ronaldo e Zarele, que me acolheram em sua casa como filho no início de minha formação médica, aos quais serei sempre grato.

Aos meus orientadores, Telma e Ricardo, pelas sugestões e conselhos na condução desse trabalho.

Ao professor Sérgio e à técnica Cleonice, pela cuidadosa e imprescindível ajuda no trato dos animais utilizados na pesquisa.

À Daniela Schwingel e ao Instituto de Patologia de Passo Fundo, pela colaboração da análise histológica.

Aos Drs. Cassiano Forcelini, pela ajuda na elaboração do projeto de pesquisa, e Adriano Pasqualotti, pelo suporte na análise estatística.

À Deus, pela vida.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

RESUMO

Almeida, Timóteo Abrantes de Lacerda. Avaliação do potencial neuroprotetor da *Spirulina platensis* em modelo de hemorragia intracerebral experimental. 2016. 44 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

A hemorragia cerebral ilustra uma das doenças com alta incidência, alta mortalidade, e com a capacidade de resultar em perda da dignidade humana, com grande número dos sobreviventes vivendo com incapacidades graves. A população idosa é especialmente susceptível ao sofrimento gerado pela perda de autonomia após um agravo agudo à saúde, uma vez que a esse evento agudo se agregam outros fatores biológicos e culturais decorrentes do envelhecimento. Com o envelhecimento populacional, é provável que o número de pacientes com doenças crônicas não infecciosas, dentre elas, a hemorragia cerebral espontânea. Trata-se de um problema de saúde pública, não somente pela alta incidência, mas devido a alta mortalidade associada e à grande incidência de incapacidade grave dentre os sobreviventes. Avaliamos o efeito do pré-tratamento com *Spirulina platensis* por um período de 30 dias em modelo experimental de hemorragia cerebral induzida por colagenase em ratos. Nós levantamos a hipótese de que a *Spirulina platensis*, bem como seu principal componente proteico, a ficocianina C, poderiam atenuar a lesão celular na zona perilesional, através de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e quelante de ferro, através da atuação nos mecanismos celulares de morte neuronal no dano cerebral secundário. Estudos experimentais são necessários para provarem o seu potencial neuroprotetor nessa patologia, bem como para determinar o período ideal de tratamento e a dose adequada.

Palavras-chave: 1. Hemorragia cerebral. 2. Acidente vascular cerebral. 3. *Spirulina platensis*. 4. Neuroproteção. 5. Neurologia experimental.

ABSTRACT

Almeida, Timóteo Abrantes de Lacerda. Analysis of the neuroprotective effect of *Spirulina platensis* in an experimental intracerebral hemorrhage model. 2016. 44 f. Dissertation (Masters in Human Aging) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

Intracerebral hemorrhage cases illustrate one of the diseases with high incidence, high mortality, and the ability to result in loss of human dignity, with a large number of survivors living with severe disabilities. The elderly population is especially susceptible to suffering by the loss of autonomy after an acute illness since the acute event aggregates to other biological and cultural factors of aging. With aging of the population, it is likely that the number of patients with non-infectious chronic diseases, including spontaneous cerebral hemorrhage, will rise. This is a complex public health problem, not only by its high incidence but due to the high associated mortality and the high incidence of severe disability among survivors. We have evaluated the effect of the pretreatment with *Spirulina platensis* for a period of 30 days in a rat model of cerebral hemorrhage. We hypothesized that *Spirulina platensis* and its major protein component, phycocyanin C, could mitigate the secondary cellular injury in the perilesional zone, through its antioxidant, anti-inflammatory and iron chelator activity, by interacting with cellular mechanisms of neuronal death. Experimental studies are required to prove its potential neuroprotective effect, as well as to determine the optimum period of treatment and appropriate dose.

Key words: 1. Intracerebral hemorrhage. 2. Stroke. 3. *Spirulina platensis*. 4. Neuroprotection. 5. Experimental Neurology.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|--------------------------------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 13 |
| 3 | PRODUÇÃO CIENTÍFICA 1: EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM SPIRULINA PLATENSIS EM MODELO DE HEMORRAGIA CEREBRAL EM RATOS | 21 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 31 |
| | REFERÊNCIAS | ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO. |
| | ANEXOS | 41 |
| | <i>Anexo A. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - UPF</i> | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |

1 INTRODUÇÃO

A hemorragia cerebral é responsável por aproximadamente 15% dos casos de acidente vascular cerebral, sendo sua incidência maior nas faixas etárias mais elevadas. Trata-se de um problema de saúde pública, não somente pela alta incidência, mas devido a alta mortalidade associada e à grande incidência de incapacidade grave dentre os sobreviventes.

Além disso, o perfil demográfico brasileiro está sendo constantemente modificado com o envelhecimento populacional, o que provavelmente modificará a frequência das doenças crônicas, com aumento, principalmente, das doenças cardiovasculares e neoplásicas. Estimativas da Organização Mundial de Saúde apontam que o Brasil será o sexto país com maior população de pessoas acima de 60 anos em 2025 (OMS / Opas, 2005). Torna-se, então, de extrema importância o conhecimento do perfil epidemiológico dessas doenças na nossa população, bem como sua implicação social e econômica, e o estudo de novos tratamentos que visem a redução da morbimortalidade associada. Segundo Camarano e Mello (CAMARANO; MELO, 2010), essa mudança da idade da população será um grande desafio, uma vez que repercute na economia, psicologia, nos fatores culturais e biológicos da sociedade.

Com o envelhecimento populacional, várias questões surgem no âmbito administrativo, se estendendo às mais diversas áreas relacionadas ao processo do envelhecimento, dentre elas a saúde pública, que se traduzem em grande dificuldade social (UNICOVSKY, 2004). No presente trabalho, focamos no estudo da hemorragia cerebral devido sua incidência predominantemente na população idosa e devido as graves consequências secundárias ao evento hemorrágico, ainda sem um tratamento definitivo que apresente as características de redução significativa da mortalidade, ao mesmo tempo em que melhore o resultado funcional dos sobreviventes, melhorando a

qualidade de vida dessas pessoas, um conceito complexo especialmente na população idosa, e reduzindo as implicações socioeconômicas dessa patologia.

O tema hemorragia cerebral faz parte de um grupo mais amplo de doenças com maior incidência na população idosa, do qual fazem parte também outras doenças cardiovasculares, neoplásicas e inflamatórias. O estudo dessas patologias possibilita uma melhora da qualidade de vida das pessoas atingidas, com o objetivo de restaurar o idoso ao seu estado funcional anterior ao evento, ou o mais próximo dele, mantendo-o ativo, autônomo e funcional (FERREIRA; TAVARES; RODRIGUES, 2011).

Descrevemos, na revisão de literatura, as características biológicas da *Spirulina platensis*, e o mecanismo proposto para a atuação da *Spirulina platensis* no tratamento da lesão neuronal secundária ao evento hemorrágico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A hemorragia cerebral espontânea é a segunda principal causa de acidente vascular cerebral, depois da forma isquêmica, sendo responsável por aproximadamente 15% da mortalidade secundária a essa patologia (KASE; KAPLAN, 1994). Apesar da alta incidência na população e da alta morbimortalidade associada à hemorragia cerebral, e dos diversos alvos terapêuticos propostos para o seu tratamento, poucas medidas se mostraram eficazes na redução desses índices (HEMPHILL et al., 2015).

A fisiopatologia da lesão cerebral relacionada ao evento hemorrágico foi bastante estudada nas últimas décadas, sendo classicamente dividida em lesões primárias e secundárias. A lesão primária está intrinsecamente relacionada ao dano tecidual causado pelo hematoma, sendo diretamente proporcional ao seu volume, de forma que hematomas volumosos e de instalação súbita são responsáveis pela maioria dos óbitos na fase aguda da hemorragia (XI; KEEP; HOFF, 2006). O tratamento cirúrgico da hemorragia cerebral espontânea atua, principalmente, no alívio do efeito de massa resultante do sangramento intraparenquimatoso.

As lesões secundárias, por sua vez, envolvem uma série de respostas teciduais às mudanças no fluxo sanguíneo, ao depósito de hemácias e lise celular, à necrose tecidual, e a um complexo sistema de estresse oxidativo, que agravam e perpetuam o dano tecidual (XI; KEEP; HOFF, 2006). Todos esses mecanismos são possíveis alvos terapêuticos na hemorragia cerebral, na tentativa de reduzir a morte neuronal no tecido perilesional, com possível benefício clínico.

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria amplamente utilizada como complemento alimentar, devido seu alto teor proteico, constituindo aproximadamente

70% do seu peso seco (SÁNCHEZ et al., 2003). Diversos estudos têm apresentado evidências quanto ao uso da *Spirulina platensis* ou da ficocianina, uma das principais ficobiliproteínas presentes na *Spirulina platensis*, como estimulantes do sistema imunológico (QURESHI; ALI, 1996), anti-inflamatório (KUMAR et al., 2009), quelante de ferro (BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008), e antioxidante (CHU et al., 2010), apresentando, assim, potencial terapêutico para ampla gama de patologias.

2.1 Mecanismos de lesão cerebral secundária

Após a injúria tecidual inicial, o tecido cerebral perilesional está exposto a uma série de eventos que podem levar a mais morte neuronal. Edema cerebral ocorre quase que imediatamente após o evento hemorrágico e aumenta nos dias subsequentes, apresentando, classicamente, 3 fases evolutivas (XI; KEEP; HOFF, 2006). Inicialmente, o edema cerebral resulta do processo de retração do coágulo e consequente eliminação de líquido para o tecido adjacente. Após esse momento inicial, ativação da cascata de coagulação, e consequente formação de trombina, leva ao aumento do edema perilesional. Além de um efeito pró-inflamatório (LEE et al., 1996), a formação de trombina favorece a quebra da barreira hematoencefálica, levando à formação de edema vasogênico (LEE et al., 1997; YANG et al., 1994). Em um terceiro momento, a lise celular, e consequente liberação de produtos do metabolismo eritrocitário, resultam em dano tecidual por estresse oxidativo e intoxicação por ferro, aumentando o edema perilesional.

A importância desses mecanismos de injúria tecidual secundária é demonstrado através de estudos do efeito de massa da hemorragia cerebral em animais, onde um grupo submetido a modelo de hemorragia cerebral experimental é comparado com um grupo onde o sangue autólogo era substituído por material oleaginoso, demonstrando formação de edema maior no modelo de hemorragia cerebral (SUZUKI; EBINA, 1980). Além disso, enquanto é improvável que algum agente terapêutico reverta o dano neuronal inicial, resultante do trauma tecidual direto pelo hematoma, diversos alvos

potenciais existem na tentativa de diminuir o dano tecidual secundário e de preservar o tecido cerebral perilesional.

Precocemente após o evento hemorrágico, inicia-se um processo inflamatório pela ativação microglial e astrocitária perilesional, além do afluente de complementos circulantes, resultando em infiltrado neutrofílico e ativação do sistema complemento, formação de complexo de ataque à membrana, e consequente lise celular (GONG; HOFF; KEEP, 2000; JENKINS; MAXWELL; GRAHAN, 1989; XI; KEEP; HOFF, 2006). Essa resposta inflamatória pode ser responsável pelo aumento do edema nas primeiras horas, e pela liberação de componentes do metabolismo do heme, através de lise celular de eritrócitos do hematoma.

A lise eritrocitária resulta na liberação de ferro no tecido cerebral adjacente. Apesar de classicamente ser apontado como desencadeador do edema cerebral tardio, hemoglobina e heme foram encontrados no tecido perilesional e no líquido antes de 48 horas após o evento hemorrágico (MARLET; BARRETO FONSECA, 1982; WU et al., 2003). Da degradação do heme, são liberados ferro, monóxido de carbono e biliverdina no tecido perilesional (KUTTY; MAINES, 1981), desencadeando uma série de reações que culminarão na morte celular. O ferro liberado é um possível agente lesivo, através de mecanismos de interação celular direta, ou da geração de radicais livres através das reações de Fenton ou Haber-Weiss (HALLIWELL, 1992, 1996).

A geração de espécies reativas de oxigênio é o principal mecanismo pelo qual o ferro livre causa lesão celular. Como consequência, reações de oxirredução, oxidação proteica, peroxidação lipídica e dano celular marcam o quadro de estresse oxidativo que, sem ação antioxidante efetiva, resultarão em morte celular por necrose ou apoptose (HICKENBOTTOM et al., 1999; SALVADOR, 2010). Além da geração de estresse oxidativo, o ferro livre pode causar lesão celular através da interação direta com o DNA ou através da inibição de mecanismos de reparo proteico (LI; SWIERCZ; ENGLANDER, 2009).

A associação entre acúmulo de ferro livre e estresse oxidativo com doenças neurodegenerativas já foi demonstrado em outros estudos (BERG; YODIM, 2006; DOUBLE et al., 2000; GÖTZ et al., 2004; HIRSCH; FAUCHEUX, 1998; MATTSON, 2004; ZECCA et al., 2006). O mecanismo pelo qual o ferro participaria da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas envolve a indução de agregação proteica, principalmente da α -sinucleína e β -amiloide (BARNHAM; BUSH, 2008), e pela geração de espécies de oxigênio reativos, incluindo oxidação proteica, peroxidação lipídica e elevação da 8-hidroxi-guanina (CALABRESE et al., 2005). Além dessas evidências, estudos em animais com quelantes de ferro, como a deferoxamina, foram capazes de demonstrar redução do estresse oxidativo e da morte celular (PEREZ; TONG; GUO, 2008).

Além disso, o estresse oxidativo pode causar ainda disfunção do fator nuclear kappa B, importante na sinalização para sobrevivência celular, levando a célula a um processo de apoptose (MATTSON; MEFFERT, 2006).

2.2 Propriedades biológicas da *Spirulina platensis*

Os radicais hidroxila, superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio são espécies de oxigênio reativo capazes de causar danos celulares irreversíveis e morte celular, mecanismo conhecido como estresse oxidativo (JURÁNEK; BEZEK, 2005). Benefício do uso da *Spirulina platensis* foi reportado em diversas patologias, atribuído, principalmente, ao seu efeito como antioxidante (CHU et al., 2010).

Dentre as moléculas antioxidantes presentes na *Spirulina platensis*, como β -caroteno, tocoferol e ácido γ -linoleico, a ficocianina C, principal pigmento da *Spirulina platensis*, tem sido estudada como neuroprotetora em modelos de estresse oxidativo (BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008; MIN et al., 2015; PENTÓN-ROL et al., 2011a). Em modelo de estresse oxidativo em fibroblastos, extrato de *Spirulina platensis* demonstrou redução estatística significativa no número de morte celular por apoptose

(CHU et al., 2010), provavelmente resultante de sua atividade antioxidante, inibindo a sinalização celular para apoptose (YANG et al., 2003). O extrato de ficocianina C também apresenta atividade antioxidante e a sua administração terapêutica e profilática demonstrou efeito neuroprotetor em modelo de isquemia cerebral global em ratos, através da redução da peroxidação lipídica e da inibição do aumento da habilidade de redução férrica plasmática (PENTÓN-ROL et al., 2011a).

O potencial antioxidante da *Spirulina platensis* foi demonstrado através do aumento da proliferação e da redução da morte celular por apoptose em astrócitos tratados com ficocianina C, apresentando um incremento nas enzimas celulares antioxidantes e redução dos fatores pró-inflamatórios (MIN et al., 2015). Estudo em ratos também demonstrou a redução da peroxidação lipídica, e da geração de radicais livres, no hipocampo de animais tratados previamente à introdução de estímulo oxidativo com glutamato monossódico (BERTOLIN et al., 2011).

Além de ser um dos principais agentes na geração de espécies de oxigênio reativas, a presença de ferro livre no sistema nervoso central favorece a depleção de fatores antioxidantes (ZHENG; BLAT; FRIDKIN, 2006). Diversos modelos experimentais tem sido utilizados na busca de propriedades neuroprotetoras interferindo nessa via metabólica, quer através de substâncias quelantes de ferro, quer através da proteção das organelas celulares contra o efeito deletério secundário ao acúmulo de ferro.

Extrato de *Spirulina platensis* demonstrou capacidade quelante de ferro através da inibição da geração de radicais hidroxila em modelo experimental (BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008). Cultura de células de neuroblastoma humano tratadas com *Spirulina platensis* 30 minutos antes do estímulo oxidativo demonstrou bloqueio dos eventos celulares desencadeados pelo íon ferroso e aumento do potencial antioxidante celular (BERMEJO-BESCÓS; PIÑERO-ESTRADA; VILLAR DEL FRESNO, 2008). O aumento do potencial antioxidante, somado à redução da peroxidação lipídica, fazem

da *Spirulina platensis* um excelente agente antioxidante, com potencial de redução de morte celular decorrente do estresse oxidativo mediado pelo acúmulo de íon ferroso.

Cultura de astrócitos tratados com ficocianina C apresentam aumento nos níveis de GFAP e de vimentina, indicando que esse tratamento induz ativação astrocitária e produção de fatores neutrofílicos (MIN et al., 2015). Como consequência, maior viabilidade astrocitária favoreceria o controle do estresse oxidativo e da resposta inflamatória (ALLAN; ROTHWELL, 2003; SAHA; LIU; PAHAN, 2006; WILSON, 1997). Além disso, a concentração de IL-6 e IL-1 β , potente citocina pró-inflamatória, foi significativamente menor nas células tratadas com ficocianina C (MIN et al., 2015).

2.3 Uso da *Spirulina platensis* na hemorragia cerebral

A hemorragia cerebral apresenta alta mortalidade e alta incidência de incapacidade grave nos pacientes que sobrevivem ao evento hemorrágico (AGUILAR; FREEMAN, 2010; HEMPHILL et al., 2015). Parte das mortes relacionadas à hemorragia cerebral são decorrentes do aumento do edema cerebral perilesional, enquanto a morte celular progressiva na zona perilesional acarreta maior risco de perda funcional e incapacidade permanente. O tratamento através da evacuação do efeito de massa, apesar de necessário em muitos casos, não demonstrou redução significativa no número de óbitos e incapacidade nos pacientes com hemorragia cerebral (HEMPHILL et al., 2015), o que indica que novos alvos terapêuticos devam ser estudados como possibilidade de tratamento desses pacientes de forma isolada ou em conjunto com outras modalidades. O dano neuronal secundário na zona perilesional apresenta diversos mecanismos de lesão celular que podem ser modificados através de terapias antioxidantes e anti-inflamatórias (Figura 1).

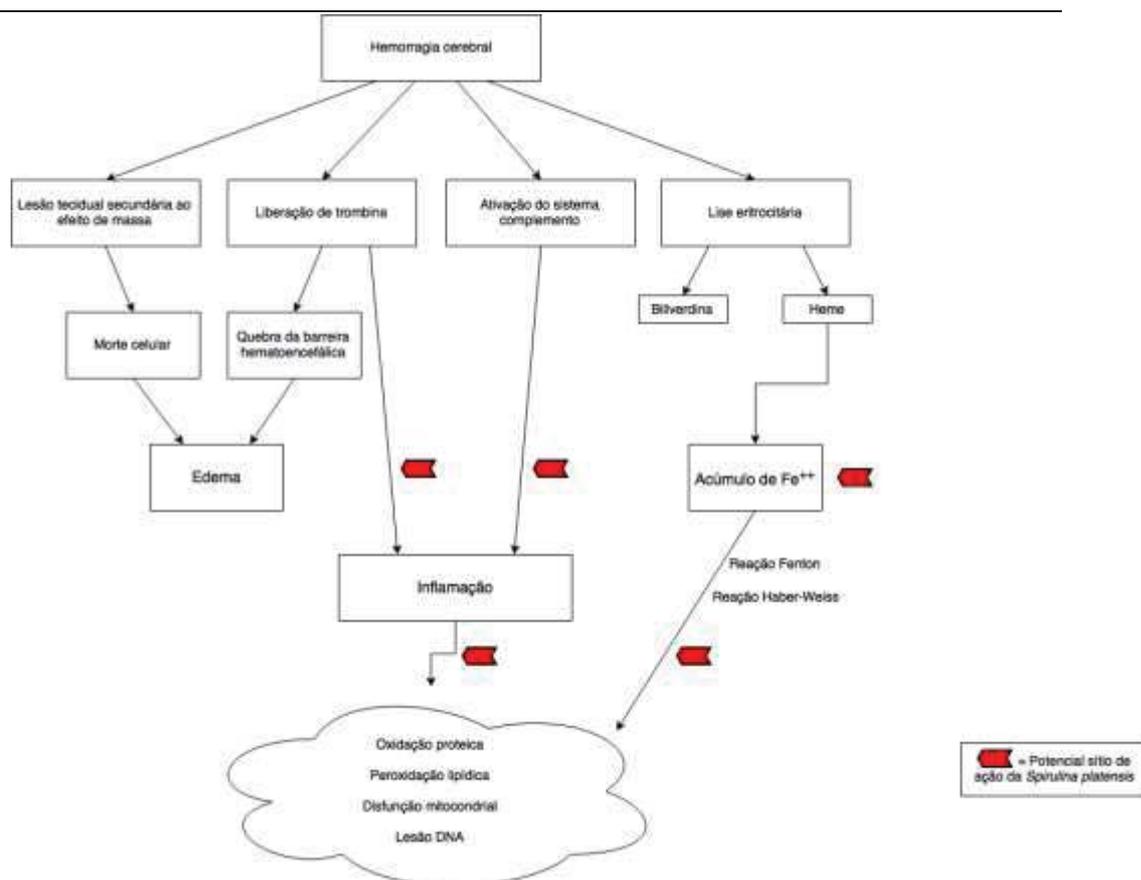


Figura 1 - Fisiopatologia da lesão cerebral secundária e potenciais sítios de ação da *Spirulina platensis*

O uso da *Spirulina platensis* em modelos animais demonstrou eficácia antioxidante e anti-inflamatória, além de boa tolerabilidade celular, com ausência de sinais de toxicidade neuronal (MIN et al., 2015). Além disso, a *Spirulina platensis* é amplamente consumida no mundo por suas propriedades nutritivas, apresentando excelente tolerabilidade. Logo, a habilidade neuroprotetora demonstrada pela *Spirulina platensis* e sua alta tolerabilidade, além da capacidade de seus metabólitos atravessarem a barreira hematoencefálica (RIMBAU et al., 1999a), fazem dela um potencial agente terapêutico para modelos patológicos cerebrais marcados por lesão oxidativa, aumento da resposta inflamatória e intoxicação por ferro.

Nós levantamos a hipótese de que a *Spirulina platensis*, bem como seu principal componente proteico, a ficocianina C, poderiam atenuar a lesão celular na zona perilesional, através de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e quelante de ferro, através da atuação nos mecanismos celulares de morte neuronal no dano cerebral secundário. Estudos experimentais são necessários para provarem o seu potencial neuroprotetor nessa patologia, bem como para determinar o período ideal de tratamento e a dose adequada. Além disso, foi descrito recentemente o potencial anti-coagulante da *Spirulina platensis*, em estudo experimental *in vitro* (KAMBLE et al., 2013), devendo o mesmo ser levado em consideração na avaliação de seu potencial terapêutico em modelos de hemorragia cerebral, quanto na escolha do melhor momento de sua introdução.

3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA 1: EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM *SPIRULINA PLATENSIS* EM MODELO DE HEMORRAGIA CEREBRAL EM RATOS

Resumo

Introdução: A hemorragia cerebral apresenta alta incidência na população, bem como alta morbimortalidade, com alta proporção dos sobreviventes apresentando incapacidade grave. Alterações no tecido parenquimatoso perilesional têm sido foco de muitos estudos, com a intenção de modificar as alterações isquêmicas e metabólicas teciduais através do emprego de agentes "neuroprotetores", com o objetivo de desenvolver estratégias que permitam a redução do dano neuronal secundário perilesional.

Metodologia: O presente projeto possui características de um estudo experimental em ratos (*Rattus norvegicus*), controlado e cego. Os animais foram divididos em grupo Spirulina, os quais receberam extrato de *Spirulina platensis* por 30 dias antes do evento hemorrágico, e grupo Controle, sendo todos submetidos ao mesmo modelo de hemorragia experimental com colagenase. Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos conforme o tempo até o abate, 6 horas, 24 horas e 30 dias. Para análise histológica, selecionamos o corte cerebral com maior volume de hemorragia, sendo este utilizado para avaliação da quantidade de neurônios viáveis na zona perilesional e em campos corticais ao longo do trajeto de punção. Os animais abatidos após 30 dias foram submetidos a avaliação neurofuncional 15 e 30 dias após o procedimento.

Resultados: O volume médio dos subgrupos 6h e 24h do grupo Controle foi de $3,89 \times 10^{-3}$ mL, enquanto no grupo *Spirulina*, o volume médio encontrado foi de $5,19 \times 10^{-3}$ mL, não apresentando diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença significativa no número de neurônios viáveis nos campos corticais ou perilesionais entre os grupos. Na avaliação neurofuncional, o grupo Controle apresentou uma proporção significativamente maior de exploração do objeto novo no teste de retenção de memória 15 dias após a hemorragia (79,3 vs 47,3 segundos, $p = ,005$).

Conclusão: O grupo pré-tratado com *Spirulina platensis* apresentou uma tendência de aumento do volume hemorrágico nas horas iniciais, o que sugere uma atividade anti-coagulante. Entretanto, a observação de um melhor resultado histológico tardio (após 24 horas da hemorragia) no grupo pré-tratado com *Spirulina platensis*, sugere que a sua atividade anti-oxidante e anti-inflamatória atua na redução da lesão neurológica secundária perilesional.

Palavras chave: *Spirulina platensis*, Neuroproteção, Hemorragia cerebral.

Introdução

A hemorragia cerebral é a segunda principal causa de acidente vascular cerebral, sendo responsável por aproximadamente 15% de todos os casos (GO et al., 2014), e tendo a hipertensão arterial sistêmica como principal fator de risco (CDC, 2013). Além de sua alta incidência, principalmente em pacientes com idade avançada, a hemorragia cerebral espontânea apresenta alta morbimortalidade, com aproximadamente 50% dos pacientes evoluindo com óbito, enquanto até 80 % dos sobreviventes apresentam incapacidade 6 meses após o evento hemorrágico (AGUILAR; FREEMAN, 2010; HEMPHILL et al., 2015).

Devido sua alta morbimortalidade, associado ao pobre resultado dos tratamentos direcionados à evacuação do hematoma na modificação da evolução funcional na maioria dos casos, as alterações no tecido parenquimatoso perilesional têm sido estudadas, com a intenção de modificar as alterações isquêmicas e metabólicas teciduais através do emprego de agentes "neuroprotetores" com ações anti-oxidantes, anti-inflamatórias, anti-excitatórias, imunomodulatórias, quelantes de ferro, e, mais recentemente, através da terapia gênica (KATHIRVELU; CARMICHAEL, 2015).

A liberação de ferro no tecido perilesional é predominantemente produto da degradação da hemoglobina, sendo responsável pelo edema tardio nos casos de hemorragia cerebral espontânea, muitas vezes fatal (DARROW et al., 1988; ENZMANN et al., 1981; XI; KEEP; HOFF, 1998). A toxicidade do ferro no parênquima cerebral ocorre, principalmente, através de agressão celular direta e da produção de espécies de oxigênio reativo (XI; KEEP; HOFF, 2006). A deferoximina (um quelante de ferro) foi amplamente estudada através de modelos experimentais de hemorragia cerebral, demonstrando redução do edema perilesional (HUANG et al., 2002; NAKAMURA et al., 2004), redução da resposta anti-inflamatória, além da redução da morte neuronal perilesional (HATAKEYAMA et al., 2011, 2013; NAKAMURA et al., 2004; OKAUCHI et al., 2010; WAN et al., 2006; WU et al., 2011).

A *Spirulina platensis* é uma microalga com alto teor proteico (55 - 70% do seu peso seco), já amplamente utilizada como suplemento alimentar (KHAN; BHADOURIA; BISEN, 2005; SIMPORE et al., 2006). Na atualidade, a *Spirulina platensis* tem ganhado atenção devido a demonstração de efeitos clínicos importantes em estudos experimentais, principalmente como anti-oxidante, anti-inflamatório e quelante do ferro (BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008; BERTOLIN et al., 2011). No presente estudo, nós buscamos verificar o efeito do pré-tratamento com *Spirulina platensis* na hemorragia cerebral, em modelo experimental com ratos.

Metodologia

Animais

A presente investigação possui características de um estudo experimental em ratos randomizado, controlado e cego. Foram utilizados 33 ratos machos da raça Wistar com peso entre 300 e 350 gramas e aproximadamente 3 meses de vida. Os ratos foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo e permanecendo em ambiente climatizado, com temperatura controlada em 21 (+/- 1) °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*.

Todos os animais foram submetidos à anestesia intramuscular com associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil® 50) na dose de 1 ml/Kg e mantidos em ventilação espontânea em ar ambiente durante todo o procedimento. Após anestesia, foram realizadas tricotomia e antissepsia do couro cabeludo com clorexidina degermante.

Os animais foram divididos em grupos Spirulina e Controle, e subdivididos conforme o tempo de abate em subgrupos 6h (6 horas após a hemorragia), 24h (24 horas após a hemorragia) e 30d (30 dias após a hemorragia). No grupo Controle, o subgrupo 6h foi composto por 6 ratos, o subgrupo 24h por 6 ratos, e o subgrupo 30d por 4 ratos, enquanto no grupo Spirulina, o subgrupo 6h foi composto por 6 ratos, o subgrupo 24h por 5 ratos, e o subgrupo 30d por 6 ratos.

Todos os ratos do grupo Spirulina receberam suplementação nutricional com *Spirulina platensis* por meio de gavagem, sendo administrado $1,67 \times 10^{-2}$ g diluídos em 2 mL de água destilada, iniciando 30 dias antes do procedimento. Esse valor foi escolhido baseado na recomendação da *Food and Drugs Administration* (FDA) de uso diário de 3 gramas por um adulto de 60 Kg.

Modelo de hemorragia cerebral

Utilizamos modelo de hemorragia experimental através da injeção de 0,5 U de colagenase VII (Sigma Chemical, USA), diluída em 2 μ L de solução salina a 0,9%, ao nível do putâmen direito. Para injeção da colagenase, foi utilizada uma seringa Hamilton® 700 series, e guiada por pontos estereotáxicos 3 mm lateral a sutura sagital, sobre a sutura coronal, uma profundidade de 6 mm, e com angulação de 90 graus em relação a sutura sagital. Após a injeção da solução, a agulha foi mantida no local por 2 minutos para evitar sangramento extra pela retirada abrupta da mesma, conforme estudos anteriores com estereotaxia (PAXINOS; WATSON, 2008). Após a hemorragia, os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura controlada em 21 (+/- 1) °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*

Avaliação neurofuncional

A avaliação neurofuncional foi realizada em uma sala silenciosa e com pouca iluminação, 15 e 30 dias após a hemorragia, e consistiu dos seguintes testes (Figura 2), conforme descrito em literatura (ALLES; COSTA, 2009):

Teste do campo aberto: o aparato dessa avaliação constituiu-se de uma caixa de madeira com dimensões de 50 x 50 cm, circundada por paredes altas de 40 cm e uma parede frontal de vidro transparente, possibilitando a observação do avaliador, com o assoalho do campo aberto dividido em 12 áreas iguais por linhas pretas. Durante o experimento, cada rato foi cuidadosamente colocado dentro da caixa, de frente para a parede posterior, permanecendo no seu interior para livre exploração por 5 minutos. As variáveis registradas foram o número de cruzamentos das linhas pretas e o comportamento de soerguimento do animal.

Teste de preensão das patas anteriores: foi medido o tempo até a queda de uma estrutura com arame de 2 mm de diâmetro com 50 cm de comprimento e a 40 cm de altura, com uma esponja macia entre os dois suportes para proteção dos animais.

Teste de reconhecimento de objetos: a tarefa consistiu em um treino no qual os animais foram expostos a um campo aberto de 50 x 50 cm, feito de madeira, com frente de vidro durante, por 20 minutos, no qual eram dispostos, de maneira equidistante, dois objetos que diferem entre si quanto à sua cor, altura, formato e textura, presos ao campo aberto pela base. Após 24 horas, um dos objetos foi substituído por outro com forma e cor diferente, e os animais mantidos na caixa por 5 minutos para livre exploração. Os objetos e o campo aberto foram limpos com etanol 70% após cada treino para remover dicas olfativas. Foi calculado o tempo de exploração de cada objeto em segundos, e o tempo percentual gasto explorando o objeto novo foi calculado, com o intuito de avaliar a memória de longa duração.

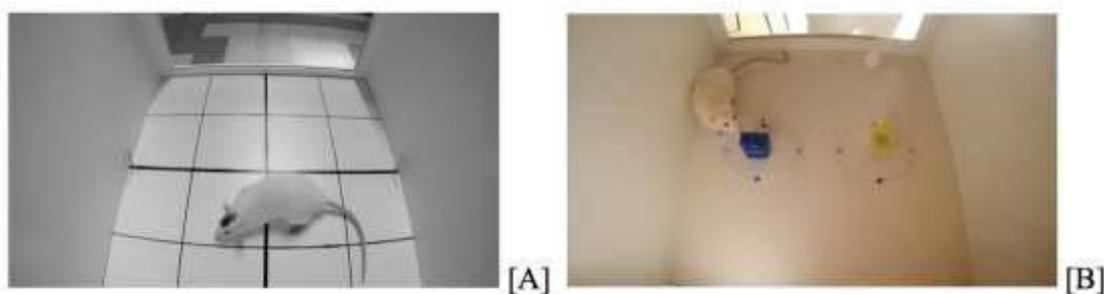


Figura 2 - A, teste do campo aberto durante avaliação da função motora; B, rato durante teste de reconhecimento de objetos

Análise histológica

Todos os ratos foram abatidos por decapitação, de modo a evitar alterações isquêmicas por hipofluxo sanguíneo cerebral, e os cérebros foram imersos em solução de formalina a 4% e, posteriormente, cortados transversalmente com uma espessura de 1 mm e embebidos em parafina. Análise histológica foi realizada no corte cerebral com

maior área hemorrágica utilizando os corantes Hematoxilina-eosina e Azul da Prússia. Foram estudados 10 campos perilesionais e 3 campos corticais no trajeto da punção cerebral, com aumento de 400 x, sendo contados o número de neurônios viáveis, através de critérios morfológicos, conforme descrito por Hoque (Figura 3).

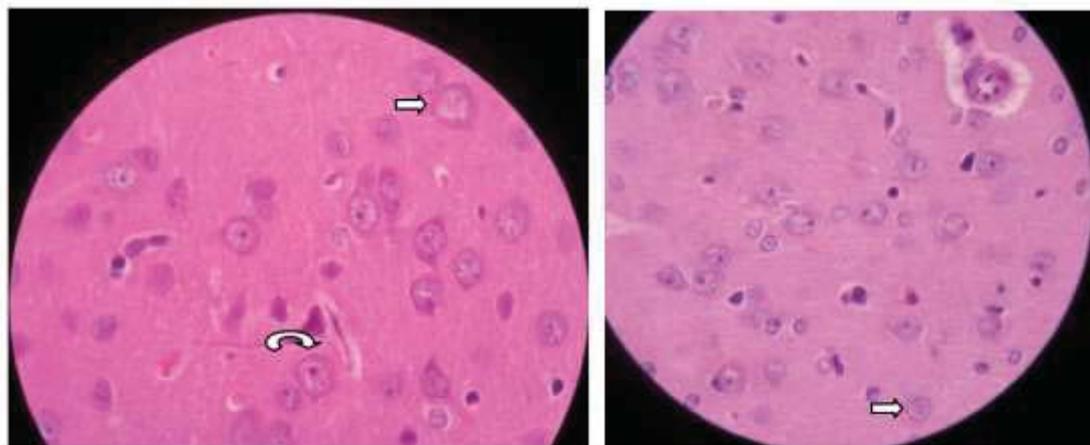


Figura 3 - Cérebro de rato (HE 400 x). Zona perilesional demonstrando células em vários estágios de lesão celular. Setas retas, cromatólise. Seta curva, tumefação celular

Resultados

O volume médio do hematoma nos subgrupos 6 h e 24 h foi $3,89 \times 10^{-3}$ mL (DP 1,77) no grupo Controle e $5,19 \times 10^{-3}$ mL (DP 3,62) no grupo Spirulina, não apresentando diferença significativa ($p = ,296$). Na análise da evolução do volume do hematoma após a hemorragia nos grupos Controle e Spirulina, notou-se maior aumento do volume entre os subgrupos 6 h e 24 h no grupo Controle ($2,99 \times 10^{-3}$ mL vs $4,79 \times 10^{-3}$ mL, $p = ,075$), enquanto no grupo Spirulina volume inicial do hematoma após 6 horas próximo ao valor encontrado após 24 horas ($5,15 \times 10^{-3}$ mL vs $5,26 \times 10^{-3}$ mL), sendo o volume do hematoma após 6 horas discretamente maior no grupo Spirulina em relação ao grupo controle ($5,15 \times 10^{-3}$ mL, DP 4,48, vs $2,99 \times 10^{-3}$ mL, DP 1,64, $p = ,294$).

Não houve diferença significativa na avaliação motora no teste de movimentação em campo aberto ($p = ,309$), ou no tempo de sustentação com patas anteriores ($p = ,113$). Também não houve diferença significativa na proporção do uso da pata esquerda (lado afetado) entre os grupos. O grupo Controle apresentou tempo de exploração do objeto novo discretamente maior no teste de retenção de memória, não sendo a diferença significativa (61,8%, DP 22,52, vs 48,9%, DP 11,68, $p = ,109$). No teste neurofuncional realizado 15 dias após a hemorragia cerebral, o grupo Controle apresentou uma proporção significativamente maior de exploração do objeto novo no teste de retenção de memória (79,3 segundos, DP 16,75, vs 47,3 segundos, DP 10,4, $p = ,005$), o que não se manteve transcorridos 30 dias da hemorragia (44,3 segundos, DP 9,35, vs 50,5 segundos, DP 13,65, $p = ,456$).

Na análise histológica, foram observados média de 139,25 neurônios viáveis nos campos perilesionais por rato no grupo Controle, e 164,82 no grupo *Spirulina* ($p = ,124$), considerados os subgrupos 6 h e 24 h. Não houve diferença significativa quando analisado o subgrupo 6 h isoladamente, entretanto, foi observado um maior número de neurônios viáveis nos campos perilesionais no grupo *Spirulina* no subgrupo 24 h (174,2 x 133,8, $p = ,08$). Não houve diferença significativa no número de neurônios viáveis nos cortes corticais no trajeto da punção ($p = ,93$).

Discussão

Diversos estudos apresentaram atividades clínicas da *Spirulina platensis* em modelos experimentais, evidenciando atividade anti-oxidante, anti-inflamatória, quelante de ferro, e imunomodulatória, sendo a ficocianina-C, principal proteína encontrada na *Spirulina platensis*, apontada como responsável por esses efeitos nesses estudos (BERMEJO-BESCÓS; PIÑERO-ESTRADA; VILLAR DEL FRESNO, 2008; BERTOLIN et al., 2011; MCCARTY; BARROSO-ARANDA; CONTRERAS, 2010; MITRA; SIDDIQUI; KHANDELWAL, 2015; PENTÓN-ROL et al., 2011b; RIMBAU et al., 1999b; SCOGLIO et al., 2014).

Bermejo-Bescós (BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008) demonstrou que o extrato de *Spirulina platensis* ou de ficocianina C apresenta potencial de redução da produção de radicais hidroxila e peroxila, além de inibir a peroxidação lipídica, e apresentam atividade quelante de ferro, tendo sido indicado como potencial tratamento para doenças neurodegenerativas, devido a ação tóxica do ferro na patogênese dessas doenças (BERMEJO-BESCÓS; PIÑERO-ESTRADA; VILLAR DEL FRESNO, 2008).

No presente estudo, não foi possível demonstrar claro efeito neuroprotetor nos animais pré-tratados com *Spirulina platensis* por 30 dias antes da hemorragia cerebral. Diferentemente dos achados em modelo de isquemia cerebral e reperfusão tratados profilaticamente ou terapêuticamente com ficocianina C, apresentando menor morte neuronal ao nível do hipocampo (PENTÓN-ROL et al., 2011a), não observamos diferença significativa na análise histológica dos neurônios viáveis na zona perilesional, nem ao nível do cortical. Entretanto, quando analisamos a lesão neuronal ao longo do tempo pós-hemorragia, observamos um maior número de neurônios viáveis perilesionais no grupo pré-tratado com *Spirulina platensis*. Esse achado é especialmente interessante quando analisado juntamente com o resultado do volume do hematoma encontrado, uma vez que menor número de neurônios viáveis seria esperado no grupo com maior volume de hemorragia, o que não se mostrou verdadeiro nos resultados encontrados. Uma possível explicação para esse resultado é que o maior volume da hemorragia precocemente após a hemorragia cerebral seria secundário ao efeito anticoagulante da *Spirulina platensis*, ao mesmo tempo em que o efeito anti-oxidante e anti-inflamatório da *Spirulina platensis* tenha sido responsável pela discrepância encontrada no número de neurônios viáveis, sugerindo, assim, seu efeito neuroprotetor.

Esses resultados corroboram com os dados apresentados por Kamble (KAMBLE et al., 2013) de que a *Spirulina platensis* possui atividade anticoagulante. Atividade anticoagulante já havia sido documentada com extrato polissacarídeo extraído da microalga *Arthrospira platensis* (MAJDOUB et al., 2009). A demonstração do efeito anticoagulante *in vivo*, juntamente com a observação de dados sugestivos da atividade

neuroprotetora da *Spirulina platensis*, a torna especialmente atrativa como opção terapêutica nas doenças cardiovasculares isquêmicas, como o acidente vascular cerebral isquêmico.

Conclusões

Demonstramos um maior volume hemorrágico nas horas iniciais no grupo pré-tratado com *Spirulina platensis*, o que sugere um possível efeito anti-coagulante, corroborando com estudos prévios com testes *in vitro*. A atividade anticoagulante da *Spirulina platensis* restringiu seu potencial terapêutico como neuroprotetor no modelo experimental de hemorragia cerebral. Entretanto, a observação de um melhor resultado histológico tardio (após 24 horas da hemorragia) no grupo pré-tratado com *Spirulina platensis*, sugere que a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória atua na redução da lesão neurológica secundária perilesional.

A *Spirulina platensis* apresenta-se como opção terapêutica atrativa para modelos de isquemia cerebral, apresentando características anticoagulante, anti-oxidante e anti-inflamatório. Essa observação sugere um um possível campo de investigação para pesquisas futuras, que objetivem analisar o efeito da *Spirulina platensis* e da ficocianina C em modelos de isquemia, correlacionando os achados histológicos com provas de coagulação plasmática e produção de espécies reativas de oxigênio.

O presente estudo apresentou algumas limitações, como a ausência de exames de imagem para a avaliação do volume do hematoma, e sua expansão ao longo das primeiras horas, e a ausência de avaliação da capacidade de coagulação sérica nos animais estudados. Além disso, a morte neuronal poderia ser melhor estudada através de métodos de imunohistoquímica. Mais estudos serão necessários para avaliação do potencial anti-coagulante da *Spirulina platensis*, bem como da sua possível aplicação clínica.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das doenças crônicas nos países em desenvolvimento possibilita o desenvolvimento de políticas de saúde voltadas para o atendimento da população em risco, seja através de investimento em pesquisas por novos tratamentos, seja na melhoria do atendimento desses pacientes no processo de fragilidade que os aflingem, secundário à doença de base. No caso específico que tratamos nesse texto, a hemorragia cerebral ilustra uma dessas doenças com alta incidência, alta mortalidade, e com a capacidade de resultar em perda da dignidade humana, com grande número dos sobreviventes vivendo com incapacidades graves.

A população idosa é especialmente susceptível ao sofrimento gerado pela perda de autonomia após um agravo agudo à saúde, uma vez que a esse evento agudo se agregam outros fatores biológicos e culturais decorrente do envelhecimento. Na atualidade, nos encontramos em um processo de envelhecimento gradual da população, o que implica na modificação dos padrões de saúde e doença que enfrentaremos nas próximas décadas. A forma como lidaremos com os problemas futuros está intrinsecamente relacionada com a preparação da população para a percepção dessas mudanças, e o conhecimento cultural, econômico e biológico desse novo arranjo social.

O tratamento da hemorragia cerebral continua um desafio para todos os profissionais da área de saúde e, principalmente, para as pessoas acometidas e seus familiares, que se inserem em um contexto novo e complexo do cuidado de pacientes com incapacidade grave. O futuro do manejo desses pacientes, provavelmente, incluirá tratamentos que visem a redução do dano neuronal secundário e terapias de substituição ou regeneração celular, possibilitando uma recuperação funcional e da autonomia dos pacientes aflingidos por essa patologia.

Por fim, da fase de concepção da idéia desse trabalho até a elaboração do presente texto, várias modificações foram necessárias, tanto no âmbito do pensamento, através do melhor conhecimento do problema e de suas implicações na população, quanto no âmbito prático que envolve a elaboração de um projeto de pesquisa e sua posterior execução. A principal mudança em relação ao projeto apresentado para qualificação foi a eliminação do estudo do efeito neuroprotetor da hipotermia em modelo de hemorragia cerebral em ratos. Essa modificação se deveu, principalmente, devido dificuldade na realização da análise imunohistoquímica necessária em tempo hábil à finalização da presente dissertação. Acreditamos na relevância e exequibilidade desse projeto para continuação em fase posterior a liberação dessa dissertação.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, M. I.; FREEMAN, W. D. Spontaneous intracerebral hemorrhage. **Seminars in neurology**, v. 30, n. 5, p. 555–64, nov. 2010.

ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Inflammation in central nervous system injury. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 358, n. 1438, p. 1669–77, 29 out. 2003.

ALLES, Y. C. J.; COSTA, J. C. **Desenvolvimento de um modelo experimental de hemorragia subependimária-intraventricular em ratos recém-nascidos.** [s.l.] Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009.

BARNHAM, K. J.; BUSH, A. I. Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 2, p. 222–8, abr. 2008.

BERG, D.; YODIM, M. B. H. Role of iron in neurodegenerative disorders. **Topics in magnetic resonance imaging**, v. 17, n. 1, p. 5–17, fev. 2006.

BERMEJO-BESCÓS, P.; PIÑERO-ESTRADA, E.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 6, p. 1496–502, set. 2008.

BERMEJO, P.; PIÑERO, E.; VILLAR, Á. M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 436–445, 2008.

BERTOLIN, T. E. et al. Antioxidant Effect of Phycocyanin on Oxidative Stress Induced with Monosodium Glutamate in Rats. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 54, n. August, p. 733–738, 2011.

CALABRESE, V. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress

response in Friedreich's ataxia. **Journal of the neurological sciences**, v. 233, n. 1-2, p. 145–62, 15 jun. 2005.

CAMARANO, A. A.; MELO, J. L. **Cuidados de longa duração para a população idosa: um novo risco social a ser assumido?** [s.l.] IPEA, 2010.

CDC. Vital Signs: Avoidable Deaths from Heart Disease, Stroke, and Hypertensive Disease — United States, 2001–2010. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 62, n. 35, p. 721-727, 2013.

CHU, W.-L. et al. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 10, p. 53, 2010.

DARROW, V. C. et al. Histologic evolution of the reactions to hemorrhage in the premature human infant's brain. A combined ultrasound and autopsy study and a comparison with the reaction in adults. **The American journal of pathology**, v. 130, n. 1, p. 44–58, jan. 1988.

DOUBLE, K. L. et al. Impaired iron homeostasis in Parkinson's disease. **Journal of neural transmission. Supplementum**, n. 60, p. 37–58, jan. 2000.

ENZMANN, D. R. et al. Natural history of experimental intracerebral hemorrhage: sonography, computed tomography and neuropathology. **American journal of neuroradiology**, v. 2, n. 6, p. 517–26, jan. 1981.

FERREIRA, P. C. S.; TAVARES, D. M. S.; RODRIGUES, R. A. P. Características sociodemográficas, capacidade funcional e morbidades entre idosos com e sem declínio cognitivo. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 29–35, 2011.

GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 129, n. 3, p. e28–e292, 21 jan. 2014.

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, 14 jul. 2000.

GÖTZ, M. E. et al. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 193–208, mar. 2004.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609–23, nov. 1992.

HALLIWELL, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochemical Society transactions**, v. 24, n. 4, p. 1023–7, nov. 1996.

HATAKEYAMA, T. et al. Deferoxamine reduces cavity size in the brain after intracerebral hemorrhage in aged rats. **Acta neurochirurgica**, v. Suppl 111, p. 185–90, jan. 2011.

HATAKEYAMA, T. et al. Deferoxamine reduces neuronal death and hematoma lysis after intracerebral hemorrhage in aged rats. **Translational stroke research**, v. 4, n. 5, p. 546–53, out. 2013.

HEMPHILL, J. C. et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 46, n. 7, p. 2032–60, 28 maio 2015.

HICKENBOTTOM, S. L. et al. Nuclear factor-kappaB and cell death after experimental intracerebral hemorrhage in rats. **Stroke**, v. 30, n. 11, p. 2472–7; discussion 2477–8, nov. 1999.

HIRSCH, E. C.; FAUCHEUX, B. A. Iron metabolism and Parkinson's disease. **Movement disorders**, v. 13, n. Suppl 1, p. 39–45, jan. 1998.

HUANG, F.-P. et al. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. **Journal of neurosurgery**, v. 96, n. 2, p. 287–93, fev. 2002.

JENKINS, A.; MAXWELL, W.; GRAHAN, D. Experimental intracerebral hematoma in the rat: sequential light microscopic changes. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 15, p. 477–86, 1989.

JURÁNEK, I.; BEZEK, S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species - cause or consequence of tissue injury? **General physiology and biophysics**, v. 24, n. 3, p. 263–78, set. 2005.

KAMBLE, S. P. et al. Extraction and purification of C-phycoerythrin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8, p. 149–153, 2013.

KASE, C. S.; KAPLAN, L. R. Intracerebral hemorrhage. **Boston: Butterworth-Heinemann**, 1994.

KATHIRVELU, B.; CARMICHAEL, S. T. Intracerebral hemorrhage in mouse models: therapeutic interventions and functional recovery. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 2, p. 449–459, 2015.

KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, P. S. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 373–9, out. 2005.

KUMAR, N. et al. Evaluation of protective efficacy of *Spirulina platensis* against collagen-induced arthritis in rats. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 181–90, jun. 2009.

KUTTY, R. K.; MAINES, M. D. Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. **The Journal of biological chemistry**, v. 256, n. 8, p. 3956–62, 25 abr. 1981.

LEE, K. R. et al. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. **Journal of neurosurgery**, v. 84, n. 1, p. 91–6, jan. 1996.

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. 272–8, fev. 1997.

LI, H.; SWIERCZ, R.; ENGLANDER, E. W. Elevated metals compromise repair of oxidative DNA damage via the base excision repair pathway: implications of pathologic iron overload in the brain on integrity of neuronal DNA. **Journal of neurochemistry**, v. 110, n. 6, p. 1774–83, set. 2009.

MAJDOUB, H. et al. Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1377–1381, 2009.

MARLET, J. M.; BARRETO FONSECA, J. DE P. Experimental determination of time of intracranial hemorrhage by spectrophotometric analysis of cerebrospinal fluid. **Journal of forensic sciences**, v. 27, n. 4, p. 880–8, out. 1982.

MATTSON, M. P. Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 37–50, mar. 2004.

MATTSON, M. P.; MEFFERT, M. K. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 852–60, maio 2006.

MCCARTY, M. F.; BARROSO-ARANDA, J.; CONTRERAS, F. Oral phycocyanobilin may diminish the pathogenicity of activated brain microglia in neurodegenerative disorders. **Medical Hypotheses**, v. 74, n. 3, p. 601–605, 2010.

MIN, S. K. et al. Assessment of C-phycoerythrin effect on astrocytes-mediated neuroprotection against oxidative brain injury using 2D and 3D astrocyte tissue model. **Sci.Rep.**, v. 5, n. 2045-2322 (Electronic), p. 14418, 2015.

MITRA, S.; SIDDIQUI, W. A.; KHANDELWAL, S. C-Phycocyanin protects against acute tributyltin chloride neurotoxicity by modulating glial cell activity along with its anti-oxidant and anti-inflammatory property: A comparative efficacy evaluation with N-acetyl cysteine in adult rat brain. **Chemico-Biological Interactions**, v. 238, n. June, p. 138–150, 2015.

NAKAMURA, T. et al. Deferoxamine-induced attenuation of brain edema and neurological deficits in a rat model of intracerebral hemorrhage. **Journal of neurosurgery**, v. 100, n. 4, p. 672–8, abr. 2004.

OMS / Opas. Envelhecimento humano: uma política de saúde. Brasília, 2005.

OKAUCHI, M. et al. Deferoxamine treatment for intracerebral hemorrhage in aged rats:

therapeutic time window and optimal duration. **Stroke**, v. 41, n. 2, p. 375–82, fev. 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Sixth ed. [s.l.] Academic Press, 2008.

PENTÓN-ROL, G. et al. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 1-2, p. 42–52, 2011a.

PENTÓN-ROL, G. et al. C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 29–38, 2011b.

PEREZ, C. A.; TONG, Y.; GUO, M. Iron Chelators as Potential Therapeutic Agents for Parkinson's Disease. **Current bioactive compounds**, v. 4, n. 3, p. 150–158, 1 out. 2008.

QURESHI, M. A.; ALI, R. A. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 18, n. 3, p. 457–63, ago. 1996.

RIMBAU, V. et al. Protective effects of C-phycoerythrin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. **Neuroscience letters**, v. 276, n. 2, p. 75–78, 1999a.

RIMBAU, V. et al. Protective effects of C-phycoerythrin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. **Neuroscience letters**, v. 276, n. 2, p. 75–8, 3 dez. 1999b.

SAHA, R. N.; LIU, X.; PAHAN, K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- α : a case for the neuroprotective role of cytokine. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 212–22, set. 2006.

SALVADOR, G. A. Iron in neuronal function and dysfunction. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 36, n. 2, p. 103–10, jan. 2010.

SÁNCHEZ, M. et al. **SPIRULINA (ARTHROSPIRA): AN EDIBLE MICROORGANISM: A REVIEW** *Universitas Scientiarum*, 10 jan. 2003.

SCOGLIO, S. et al. Selective monoamine oxidase B inhibition by an *Aphanizomenon flos-aquae* extract and by its constitutive active principles phycocyanin and mycosporine-like amino acids. **Phytomedicine**, v. 21, n. 7, p. 992–997, 2014.

SIMPORE, J. et al. Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. **Nutrition journal**, v. 5, p. 3, jan. 2006.

SUZUKI, J.; EBINA, T. Sequential changes in tissue surrounding ICH. In: PIA, W.; LONGMAID, C.; ZIERSKI, J. (Eds.). . **Spontaneous intracerebral hematomas**. [s.l: s.n.]. p. 121–128.

UNICOVSKY, M. A. R. Idoso com Sarcopenia: uma abordagem do cuidado da enfermeira. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 57, n. 3, p. 298–302, 2004.

WAN, S. et al. Deferoxamine reduces CSF free iron levels following intracerebral hemorrhage. **Acta neurochirurgica**, v. Suppl 96, p. 199–202, jan. 2006.

WILSON, J. X. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 75, n. 10-11, p. 1149–63, jan. 1997.

WU, H. et al. Iron toxicity in mice with collagenase-induced intracerebral hemorrhage. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 31, n. 5, p. 1243–50, maio 2011.

WU, J. et al. Iron and iron-handling proteins in the brain after intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 34, n. 12, p. 2964–9, dez. 2003.

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. 991–6, dez. 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, jan. 2006.

YANG, G. Y. et al. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats. **Journal of neurosurgery**, v. 81, n. 1, p. 93–102, jul. 1994.

YANG, L. et al. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. **Cancer research**, v. 63, n. 4, p. 831–7, 15 fev. 2003.

ZECCA, L. et al. A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 67, n. 7 Suppl 2, p. S8–11, 10 out. 2006.

ZHENG, H.; BLAT, D.; FRIDKIN, M. Novel neuroprotective neurotrophic NAP analogs targeting metal toxicity and oxidative stress: potential candidates for the control of neurodegenerative diseases. **Journal of neural transmission. Supplementum**, n. 71, p. 163–72, jan. 2006.

ANEXOS

Anexo A. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - UPF



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PARECER Nº 003/2015

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 21/11/14, analisou o projeto de pesquisa "Propriedades neuroprotetoras da hipotermia cerebral seletiva e da *Spirulina platensis* na hemorragia cerebral", registro na CEUA Nº 022/2014, de responsabilidade do pesquisador **Timóteo Abrantes de Lacerda Almeida**. Após a análise a Comissão, foram apontadas pendências no protocolo as quais foram devidamente atendidas pelo pesquisador.

Em relação aos aspectos éticos, a Comissão considerou o projeto relevante e com relação custo-benefício adequada. O pesquisador e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

O pesquisador deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.

Situação: **PROCOLO APROVADO**

Passo Fundo, 07 de abril de 2015.

Prof. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini
Coordenadora - CEUA - UPF



PPGEH

Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano
Faculdade de Educação Física e Fisioterapia - FEFF