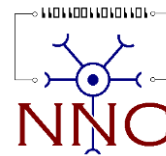




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**



BEATRIZ LOPES TECEDOR BASSI

**EFEITOS DA ALAMANDINA EM FATIAS HIPOCAMPAIS SUBMETIDAS À
PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE**

**BELO HORIZONTE
2019**

BEATRIZ LOPES TECEDOR BASSI

**EFEITOS DA ALAMANDINA EM FATIAS HIPOCAMPAIS SUBMETIDAS À
PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE**

Dissertação desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini
Coorientadora: Prof^a. Dra. Gisele Eva Bruch

BELO HORIZONTE
2019

043

Bassi, Beatriz Lopes Tecedor.

Efeitos da alamandina em fatias hipocampais submetidas à privação de oxigênio e glicose [manuscrito] / Beatriz Lopes Tecedor Bassi. . - 2019.

68 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini. Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Eva Bruch.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências. 2. Neuroproteção. 3. Sistema renina-angiotensina. 4. Isquemia. 5. Alamandina. I. Massensini, André Ricardo. II. Bruch, Gisele Eva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITOS DA ALAMANDINA EM FATIAS HIPOCAMPAIS SUBMETIDAS À
PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE

BEATRIZ LOPES TECEDOR BASSI

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

Aprovada em 09 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Andre Ricardo Massensini - Orientador
UFMG

Prof(a). Gisele Eva Bruch
UFMG

Prof(a). Valita Helen Ferreira Vieira
FACSETE

Prof(a). Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira
UFMG

Belo Horizonte, 9 de agosto de 2019.

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio das seguintes agências de fomento:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

*aos meus avós, meus pés e braços na caminhada desde pequena
à minha mãe, exemplo de amor e dedicação,
e ao meu irmão, meu melhor amigo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por todas as possibilidades que obtive desde que comecei minha vida acadêmica e todas as graças que recebo diariamente, que são minha fonte de força e determinação.

Quero agradecer à minha família por toda educação e amor que me deram desde que nasci que foram essenciais para criação dos meus valores e determinação em seguir meus sonhos. Ao meu avô e padrinho de formatura, meu maior exemplo de amor, força e dedicação; à minha avó, que me ensinou a ler e escrever e me formou um ser humano; à minha mãe, que sempre me apoiou, dona de um enorme coração e por quem tenho grande admiração e ao meu irmãozinho, meu melhor amigo.

Eu não estaria no mestrado se não fosse pelo professor Wendel Fernandes Simões, que com muita dedicação e carinho me mostrou o caminho para a pós-graduação e foi meu mentor para que eu conseguisse chegar onde estou.

A pessoa que eu mais tenho que agradecer sem dúvidas é o professor André que foi o anjo que abriu as portas do seu laboratório para receber uma completa estranha e despreparada recém-formada. Muito obrigada, André, o seu sim abriu portas para mim que jamais conseguiria sem você.

No começo do meu mestrado tive o grande prazer de ter duas pós-docs como grandes mentoras me ensinando tudo o que precisaria saber para meus experimentos, a Talita e a Iaci. Também neste caminho a aluna de doutorado, na época de mestrado, Lorena foi crucial para me mostrar o laboratório e me ajudar em simplesmente tudo o que tinha dúvida, além de ter criado a linda figura 2 para mim!!

Quero agradecer ao Marco Túllio, aluno de iniciação científica, que me ensinou a técnica que seria o carro chefe dos meus experimentos e à aluna Isabelle por todo apoio e ajuda nestes infindáveis experimentos. Ao Eduardo, Maria Clara, Fernanda, Maria Luíza, Lukas, Jade e Anna Paula, os novos alunos que chegaram por último, mas que ajudaram muito no fim do meu mestrado.

Agora, meu obrigada especial para três pessoas maravilhosas que se não fossem por elas eu não estaria escrevendo minha dissertação e foram extremamente importantes nesta minha caminhada: à Gisele, minha co-orientadora, que me ensinou a pensar cientificamente (como cientista!!), me ajudou e apoiou em

todos os passos dos meus experimentos e se tornou uma grande amiga que posso contar sempre que preciso; ao Leonardo Guarnieri, que com sua experiência e com muito carinho me ajudou a resolver os maiores problemas que tive durante os experimentos e me mostrou a luz várias vezes; e, por último, mas não menos importante, ao pós-doc Flávio Mourão (e sua impecável dissertação), por ter sido a base dos meus experimentos e mesmo estando na Inglaterra não hesitou em me ajudar e tirar minhas intermináveis dúvidas por WhatsApp.

A todos os alunos do NNC que de diversas formas me ajudaram e foram grandes amigos nesta minha jornada. Ao Taquinho, por toda a ajuda constante no laboratório e ao Osman, pelos chocolates e pela ajuda em consertar e criar vários utensílios importantes para uso cotidiano no laboratório. Aos professores no NNC por todo ensinamento que recebo diariamente. Ao professor Bruno, pelas conversas muito instrutivas; ao professor Cleiton, por tornar minhas apresentações e dias mais divertidos e aos professores Márcio, Grace e Juliana, por todo o aprendizado.

Ao professor Robson, do laboratório de Hipertensão, que colaborou com nossos experimentos com a alamandina. À professora Luciene da Farmacologia por nos emprestar o NAD⁺.

Ao laboratório de Imunologia Celular e Molecular, especialmente ao professor Elio e ao professor Dawidson, pelas centenas de vezes que me deixaram usar o espectrofotômetro e o espectrofluorímetro que salvaram muitas vezes meus experimentos.

Um agradecimento especial à Gislene, técnica do laboratório Multiusuário, que me ajudou em diversas vezes com minhas análises no espectrofotômetro.

À empresa Quibasa por gentilmente doar para o nosso grupo os kits de LDH, através do Projeto Bioclin Educar, que foram imprescindíveis para realização dos ensaios deste estudo.

E, por fim, meu muito obrigado a todas as pessoas que de alguma forma estiveram comigo e me ajudaram a dar cada passo nesta caminhada.

MUITO OBRIGADA!!

“ Temos de acreditar em nós mesmos ou mais ninguém acreditará; temos de acompanhar nossas aspirações com competência, coragem e determinação para atingir o sucesso. ”

Rosalyn Yalow

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma das doenças vasculares que mais acomete pessoas no mundo e uma das principais causas de morte e incapacidade. Os tratamentos existentes são pouco eficazes, por isso são necessários estudos que avaliem substâncias que tenham a capacidade de proteger o cérebro dos mecanismos deletérios de uma isquemia. Neste estudo, a alamandina, um peptídeo pertencente ao sistema renina-angiotensina (SRA), foi estudada e sua ação analisada nos períodos de isquemia e reperfusão em um modelo de isquemia *in vitro* em fatias hipocâmpais de camundongos machos C57/Bl6 de 8 semanas de idade (N = 7 por grupo; protocolo CEUA / UFMG nº: 178/2014). As fatias foram, primeiramente, pré-incubadas com aCSF (Fluido cérebro-espinhal artificial) com glicose e aerados com 95% de O₂ e 5% de CO₂ por 90 minutos. Posteriormente, o grupo controle continuou recebendo a mesma condição e o grupo isquêmico recebeu um aCSF sem glicose e aerado com 95% de N₂ e 5% de CO₂ por 60 minutos, para simular um evento isquêmico. Depois disso, o sobrenadante foi coletado e o tempo de reperfusão iniciado. Uma curva de concentração x resposta foi gerada com as concentrações de 0.01nM, 0.1nM, 1nM, 10nM e 100nM de alamandina e foram analisados o dano celular, a excitotoxicidade glutamatérgica, a ação do receptor MrgD e a morte celular. Todas as análises dos dados foram realizadas usando ANOVA two-way (p <0,05). Os resultados mostraram que a concentração de 1nM é capaz de proteger as fatias hipocâmpais dos danos celulares quando analisada a liberação de lactato desidrogenase e as concentrações de 1nM e 10nM foram capazes de reduzir o dano através da redução da liberação de glutamato. No entanto, frente ao antagonismo do receptor MrgD, a alamandina perdeu sua ação protetora. Quando avaliado o período da reperfusão, ela não foi capaz de proteger as fatias do dano quando avaliada a liberação de LDH, porém pode ser observada proteção da morte celular, quando marcada com etídio homodímero e analisada microscopicamente. De um modo geral, os resultados sugerem que a alamandina é potencial protetora de dano e morte celular e mais estudos devem ser realizados dos mecanismos que ocorrem durante a reperfusão.

ABSTRACT

Stroke is one of the most common vascular diseases in the world and one of the leading causes of death and disability. Existing treatments are ineffective, so studies are needed to evaluate substances that have the ability to protect the brain from the deleterious mechanisms of an ischemia. In this study, alamandine, a peptide belonging to the renin-angiotensin system (RAS), was studied and its action analyzed during ischemia and reperfusion periods in an *in vitro* ischemia model in hippocampal slices from C57/Bl6 male mice 8 weeks-old (N = 7 per group; CEUA / UFMG protocol No. 178/2014). The slices were first preincubated with aCSF (artificial cerebrospinal fluid) with glucose and bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ for 90 minutes. Afterward, the control group continued to receive the same condition and the ischemic group received a glucose-free aCSF, bubbled with 95% N₂ and 5% CO₂ aCSF for 60 minutes to mimic an ischemic event. After that, the supernatant was collected and the reperfusion time started. A dose x response curve was generated with the concentrations of 0.01nM, 0.1nM, 1nM, 10nM and 100nM of alamandine and the cell damage, glutamatergic excitotoxicity, MrgD receptor action and cell death were analyzed. All data analyzes were performed using two-way ANOVA ($p < 0.05$). The results showed that the 1nM concentration is able to protect hippocampal slices from cellular damage when lactate dehydrogenase release was analyzed and concentrations of 1nM and 10nM were able to reduce damage by reducing glutamate release. However, in the face of MrgD receptor blockade, alamandine lost its protective action. However, when the reperfusion period was evaluated, it was not able to protect the slices from damage when evaluated the LDH release, but protection from cell death can be observed when labeled with homodimer etidium and analyzed microscopically. Overall, the results suggest that alamandine is a potential protector of cell damage and death, and further studies should be conducted of the mechanisms that occur during reperfusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do processo isquêmico e hemorrágico.

Figura 2: Esquema dos mecanismos patofisiológicos durante uma isquemia cerebral.

Figura 3: Danos cerebrais causados por um evento isquêmico em uma escala de tempo.

Figura 4: Cascata do sistema renina angiotensina composta pela via clássica e pela via alternativa.

Figura 5: Imagem representativa do peptídeo alamandina.

Figura 6: Delineamento experimental da curva concentração x resposta da alamandina

Figura 7: Delineamento experimental para avaliação da ação dos antagonistas

Figura 8: Delineamento experimental para determinação da liberação de glutamato

Figura 9: Delineamento experimental para avaliação da viabilidade celular

Figura 10: Curva concentração x resposta da alamandina durante o período de isquemia em fatias hipocámpais de camundongos submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.

Figura 11: Ação do antagonista do receptor MrgD, o d-Pro, na concentração de 5nM em fatias hipocámpais submetidas a privação de oxigênio e glicose

Figura 12: Liberação de glutamato em fatias hipocámpais submetidas a privação de oxigênio e glicose

Figura 13: Curva concentração x resposta da alamandina durante o período de reperfusão em fatias hipocámpais de camundongos submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.

Figura 14: Viabilidade celular da região de CA1 de fatias hipocámpais de camundongos submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: lista de abreviaturas

Tabela 2: lista de equipamentos utilizados nos experimentos

Tabela 3: lista de soluções utilizadas nos experimentos

Tabela 4: lista dos reagentes utilizados nos experimentos

Tabela 1: lista de abreviaturas

aCSF	Fluido cérebro-espinhal artificial
Ala	Alanina
Alam	Alamandina
AMP	5'-monofosfato adenosina
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-4-isoxazolpropionico
AMPK	5 proteína quinase ativada por AMP
Ang A	Angiotensina A
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-5)	Angiotensina-(1-5)
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
BHE	Barreira hematoencefálica
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAST	Face, arm, speech, time
FDA	Food and Drug Administration
GDH	Glutamato desidrogenase
GPF	6-O-galloyl paeoniflorin
IL	Interleucina
KRH	Krebs-Hinger HEPES
LPS	Lipopolissacarídeo
MCAo	Oclusão da artéria cerebral média
MrgD	Mas relacionado ao receptor acoplado à proteína G
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NRF2	Fator nuclear eritroide 2
NRF2	Fator nuclear eritroide 2
OGD	Privação de oxigênio e glicose
PB	Tampão fosfato
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SIRT6	Sirtuina 6
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema renina angiotensina
t-Pa	Ativador de plasminogênio tecidual
TIA	Ataque transiente isquêmico
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1.	O Acidente Vascular Encefálico.....	18
1.1.1	Epidemiologia.....	18
1.1.2	Fisiopatologia do AVE.....	19
1.1.3	Fisiopatologia do AVE isquêmico	21
1.2.	Tratamentos existentes	26
1.3.	Estudos experimentais de neuroproteção durante um AVE	28
1.4.	Sistema Renina-Angiotensina	30
1.4.1	Alamandina: o novo peptídeo e seus estudos	32
1.4.2	O receptor MrgD	37
2	JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS.....	44
3.1.	Objetivo geral.....	44
3.2.	Objetivos específicos.....	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1.	Métodos.....	46
4.1.1	Animais.....	46
4.1.2	Equipamentos	46
4.1.3	Soluções	47
4.1.4	Reagentes.....	49
4.1.5	Preparação do tecido cerebral.....	49
4.1.6	Privação de oxigênio e glicose (OGD) – modelo de insulto isquêmico <i>in vitro</i>	49
4.1.7	Curva dose x resposta	50
4.1.8	Antagonistas.....	51
4.1.9	Ensaio para quantificação de lactato desidrogenase liberada	52
4.1.10	Dosagem de proteínas	53
4.1.11	Ensaio para quantificação do glutamato liberado	53
4.1.12	Ensaio para quantificação de morte / viabilidade celular	55
4.1.13	Análise estatística	57
5	RESULTADOS	58
5.1.	PERÍODO DA ISQUEMIA	59
	Curva concentração x resposta.....	59
	Antagonismo do receptor específico da alamandina	61
	Liberação de glutamato	62

5.2. PERÍODO DA REPERFUSÃO.....	63
Viabilidade celular.....	64
6 DISCUSSÃO.....	67
6.1. ISQUEMIA.....	70
Curva concentração x reposta	70
Alamandina e seu receptor específico MrgD.....	72
Glutamato	74
6.2. REPERFUSÃO	75
Viabilidade celular.....	76
7 Considerações finais	80
8 CONCLUSÃO	82
9 REFERÊNCIAS.....	84

“ Eu fui ensinada que o caminho do progresso não é nem rápido, nem fácil. ”

Marie Curie

1.1. O Acidente Vascular Encefálico

1.1.1 Epidemiologia

O Acidente Vascular Encefálico (AVE), popularmente conhecido como derrame, é a primeira causa de incapacidade e a segunda de morte no mundo. De acordo com recentes informações da *American Heart Association*, aproximadamente 2,7% dos adultos americanos irá sofrer um AVE em algum ponto de suas vidas e sua prevalência aumenta com o envelhecimento tanto em mulheres como em homens, sendo que em mulheres há um maior risco. Depois de um AVE, por volta de 3% dos homens e 2% das mulheres tornam-se incapacitados. Além disso, o AVE causa 1 em cada 19 mortes nos EUA (BENJAMIN et al., 2018)

Em 2015, 42,4 milhões de pessoas foram afetadas por doenças cerebrovasculares, entre elas, 24,9 milhões por isquemia e 18,7 por hemorragia. Em relação a mortes, entre os isquêmicos, 3 milhões morreram e, hemorrágicos, 3,3 milhões de pessoas. O AVE isquêmico acomete 87% dos casos e o hemorrágico intracerebral, 10%, enquanto o hemorrágico subaracnoide 3% dos casos.

Nos Estados Unidos da América, a cada 40 segundos uma pessoa é acometida. Entre 2013 e 2014, \$40,1 bilhões de dólares foram gastos direta e indiretamente com cuidados com pacientes (BENJAMIN et al., 2018).

Os dados epidemiológicos no Brasil acompanham os elevados números mundiais. Segundo a Sociedade Brasileira de Neurologia foram contabilizados em média 100 mil óbitos por ano em consequência do AVE, e a cada 5 minutos, uma

pessoa é acometida pela doença (CESÁRIO; PENASSO, 2006). Corroborando com os dados mundiais apresentados acima, há maior incidência em mulheres quando comparados com os homens.

Em relação aos custos despendidos pelo governo, através do Sistema Único de Saúde (SUS), foram gastos no ano de 2011, 200 milhões de reais em internações, não sendo contabilizados neste número os custos com tratamento e acompanhamento dos pacientes.

1.1.2 Fisiopatologia do AVE

O AVE é uma condição patológica que ocorre quando há diminuição do fluxo sanguíneo em uma parte do tecido cerebral, com consequente interrupção do aporte de glicose, nutrientes e oxigênio para as células próximas e redução para as células mais distantes.

Após um insulto, pode ocorrer a reperfusão, em que o fluxo sanguíneo é restituído e o tecido reoxigenado, causando morte excessiva das células ((ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). O local onde há parada do aporte sanguíneo e ocorre morte celular por necrose é chamado de core e a área onde há diminuição do aporte e morte por apoptose ao longo do tempo, após o insulto e que ainda pode ser salva é chamada de penumbra (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Essa condição pode ser dividida em dois tipos: isquêmica e hemorrágica (Figura 1). A primeira é um dano cerebral causado quando o vaso é bloqueado por um coágulo, agregação plaquetária ou aterosclerose, interrompendo o fluxo sanguíneo e mantendo sintomas neurológicos por mais de 24 horas, enquanto que

ataque isquêmico transiente (TIA) dura menos de 24 horas (SACCO et al., 2006) o segundo pode ser dividido em intracerebral (mais comum) quando um vaso fraco rompe-se e há extravasamento do sangue para o parênquima, e subaracnoide, normalmente causada por um hipertensão arterial (MAYER; RINCON, 2005; RAFII; HILLIS, 2006).

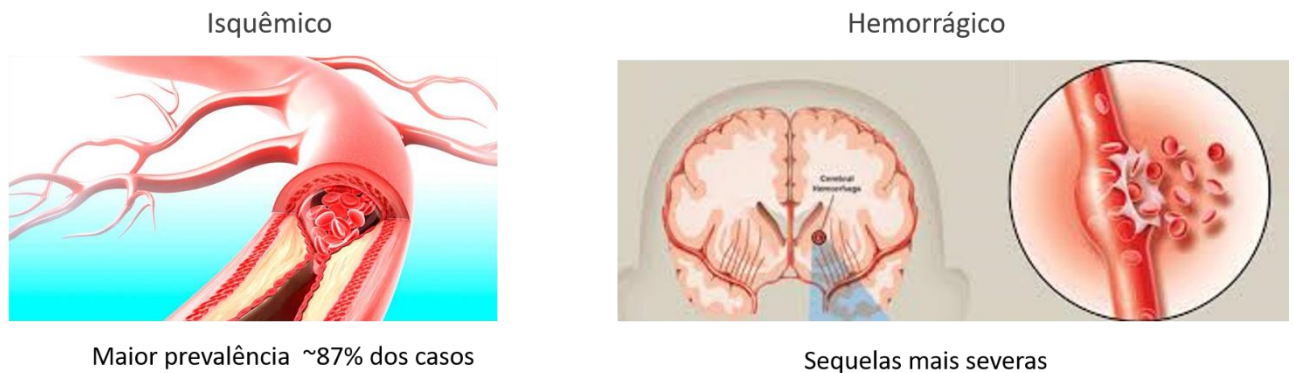


Figura 1: Representação do processo isquêmico e hemorrágico

Durante o processo isquêmico o vaso é bloqueado e o fluxo sanguíneo é cessado. No processo hemorrágico o vaso enfraquecido se rompe e há extravasamento do sangue para o parênquima. Retirado e adaptado de American Heart Association em 13 de maio de 2019.

Diversos fatores podem contribuir para o aumento do risco de uma isquemia como pressão alta e distúrbios no ritmo cardíaco (determinantes fortes), diabetes mellitus, fumo, nutrição (falta de boa alimentação), histórico familiar e genético e problemas renais. Existe um teste que pode ser feito com o objetivo de saber rapidamente quando uma pessoa está sofrendo um AVE chamado FAST (Face, Arm, Speech e Time) que analisa fraqueza facial, fraqueza dos braços, problemas na fala e tempo (ser rápido para ligar para a emergência); além destes sintomas, também pode ocorrer visão turva repentinamente, confusão, queda ou dores de cabeça (BENJAMIN et al., 2018).

Com o intuito de entender melhor os mecanismos de um AVE isquêmico, camundongos e ratos são os modelos mais comuns, mas coelhos e primatas também são opções devido às suas similaridades com os seres humanos (CASALS et al., 2011).

Para melhor entender as consequências de um AVE, é importante saber os mecanismos que levam as células à morte e as consequências para os seres afetados.

1.1.3 Fisiopatologia do AVE isquêmico

Após o bloqueio de um vaso no sistema nervoso central (SNC), uma cascata bioquímica começa dando origem aos primeiros sinais de morte celular. A interrupção do suprimento de oxigênio e glicose desencadeia falta de produção de ATP (adenosina trifosfato), energia necessária para as células, resultando em falha energética, perturbando a homeostasia iônica. Excitotoxicidade, ruptura da membrana celular, dano mitocondrial e no DNA são caminhos deletérios descritos em uma isquemia (Figura 2).

Após um evento isquêmico, a área danificada revela duas regiões diferentes: o core e a penumbra. A região do core é próxima à parada do fluxo sanguíneo e condensa a maior parte da morte celular. Na penumbra isquêmica, há células danificadas que ainda são viáveis, mas o risco de morte aumenta se a circulação não for rapidamente restaurada (MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010).

Quando ocorre a falha energética, o potencial de membrana das células neuronais é comprometido causando despolarização, aumentando o influxo de Ca^{2+} e Na^{+} (DEB; SHARMA; HASSAN, 2010; KATSURA; KRISTIÁN; SIESJÖ,

1994). O aumento do influxo de Ca^{2+} estimula a liberação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato, que pode ser encontrado em altos níveis no líquido cérebro-espinhal (CASTILLO; DÁVALOS; NOYA, 1997; DÁVALOS et al., 1997). Uma vez liberado, ele liga-se continuamente aos seus receptores ionotrópicos (AMPA, cainato, NMDA) causando aumento do influxo de íons Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- ; o que resulta em influxo de água e consequente edema citotóxico (DEB; SHARMA; HASSAN, 2010; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; FURUKAWA et al., 1997; KOSTANDY, 2012).

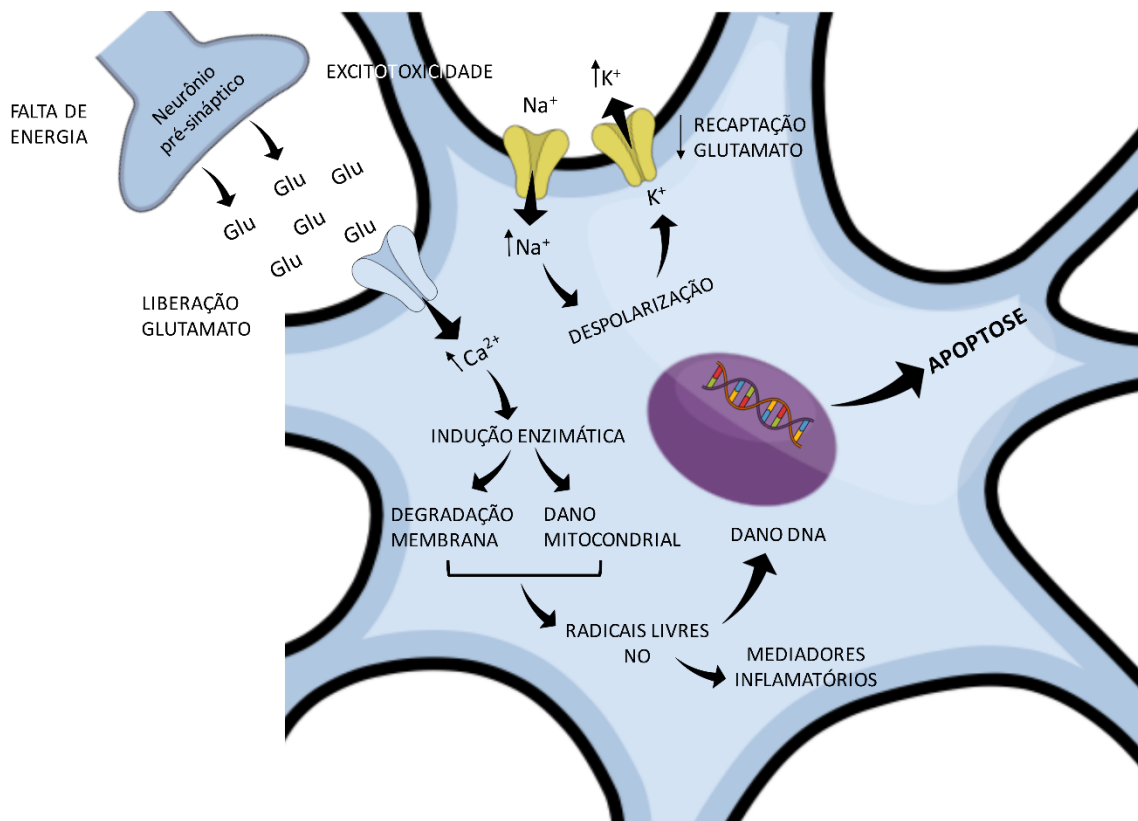


Figura 2: Esquema dos mecanismos fisiopatológicos durante uma isquemia cerebral.

Após o evento isquêmico, há falha energética, ocasionando um excesso de entrada de íons Ca^{2+} e Na^+ , causando despolarização celular, com consequente edema. O influxo de Ca^{2+} aumentado estimula a liberação de glutamato, que não é retirado da fenda sináptica, causando excitotoxicidade, gera indução enzimática, causando degradação da membrana com formação de radicais livres e óxido nítrico, danificando o DNA celular. Com isso, há facilitação da entrada de mediadores inflamatórios, causando ativação microglial e infiltração leucocitária. A entrada de Ca^{2+} citada acima e a formação dos radicais livres também é responsável por danos na mitocôndria ocasionando apoptose.

Recentemente foi descoberto que um miRNA específico também pode regular a neurotransmissão glutamatérgica e a toxicidade durante uma isquemia cerebral (MAJDI et al., 2016). Transportadores de aminoácidos excitatórios presentes em astrócitos são responsáveis pela recaptura do glutamato, com o objetivo de regular sua concentração na fenda sináptica e não o tornar tóxico para as células neuronais.

Entretanto, no decorrer de um evento isquêmico as células gliais tornam-se reativas, o que dificulta a recaptura do glutamato. Como consequência, o glutamato acumula-se na fenda sináptica causando sobrecarga de Ca^{2+} intracelular e resultando em excitotoxicidade (KOSTANDY, 2012; KYLE; SAHA, 2014). Além disso, os astrócitos também podem desempenhar um papel no evento isquêmico transferindo suas mitocôndrias para o neurônio em sofrimento. Este fenômeno foi recentemente descrito e observado em modelo *in vitro* de co-cultura de astrócitos/neurônios. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para melhor entender os mecanismos deste deslocamento mitocondrial (BERRIDGE; SCHNEIDER; MCCONNELL, 2016; HAYAKAWA et al., 2016; VERMEHREN et al., 2018).

A sobrecarga intracelular de Ca^{2+} também resulta na ativação de enzimas proteolíticas e hidrólise de proteínas do citoesqueleto. Fosfolipase A e ciclooxigenases induzem produção de radicais livres, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO). O influxo do cálcio aumenta a produção de óxido nítrico pela ativação da NO sintase (GROTTA; HELGASON, 1999). O começo do dano oxidativo resulta em lipoperoxidação e danos na membrana celular (DIRNAGL;

IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999) seguido por um decaimento na atividade de enzimas antioxidantes (MILANLIOGLU et al., 2016).

Os radicais livres podem causar dano tecidual, liberação de citocinas pró-inflamatórias, apoptose e cicatrizes gliais (BARRES, 2008; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). O fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a proteína C reativa, a interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-8 são citocinas reativas pró-inflamatórias primeiramente ativadas por neurônios, células endoteliais e astrócitos em uma situação isquêmica (DZIEDZIC, 2015; ROTHWELL; HOPKINS, 1995; SINISCALCHI et al., 2014). Esses mediadores inflamatórios podem ativar a micróglia, que pode levar a uma invasão de células inflamatórias pelo sangue (infiltração linfocitária), agravando o tecido já danificado.

A falta da energia e o influxo de Ca^{2+} provocados pela isquemia levam a um prejuízo mitocondrial. A ação contínua do Ca^{2+} desencadeia eventos citoplasmáticos e nucleares induzindo a formação de ERO's causando danos na mitocôndria, principalmente no período de reperfusão (DA SILVA et al., 2017). Esta formação e a falta de balanço na produção de NO comprometem a permeabilidade da membrana nuclear, deixando o DNA celular e o mitocondrial vulneráveis (EL ASSAR; ANGULO; RODRÍGUEZ-MAÑAS, 2013; MIKHED et al., 2015; MÜNZEL et al., 2005).

Todos estes eventos citotóxicos acima afetam a integridade da barreira hematoencefálica (BHE). Esta barreira tem um papel fundamental na regulação do tráfico de fluídos, solutos e células na interface sangue-cérebro e mantém a homeostase deste microambiente (BANKS, 2016; JIANG et al., 2018). É formada por um conjunto de células epiteliais e endoteliais e um grande número de

conectando células adjacentes, resultando na diminuição do transporte paracelular (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006). Esta barreira protege o cérebro contra substâncias consideradas tóxicas e que causariam danos cerebrais (AZAD et al., 2015). Quando em um evento isquêmico ou hemorrágico, ela pode ser danificada, principalmente por lipoperoxidação (radicais livres) que aumenta sua permeabilidade vascular, facilitando a entrada de substâncias perigosas ou terapêuticas no cérebro.

Todo este processo desencadeia a morte celular ao longo dos dias (Figura 3). As células próximas à área que sofreu o insulto (o core) morre por necrose, onde o fluxo sanguíneo pode diminuir em até 80%, mas as células mais periféricas ainda estão vivas compondo a penumbra, em que ainda há possibilidade de salvar as células, uma vez que não estão no core (HOSSMANN, 1994). Por ser considerada uma área possível de salvamento, há estudos com o interesse de encontrar uma maneira de neuroproteger o tecido cerebral dos mecanismos deletérios da isquemia.

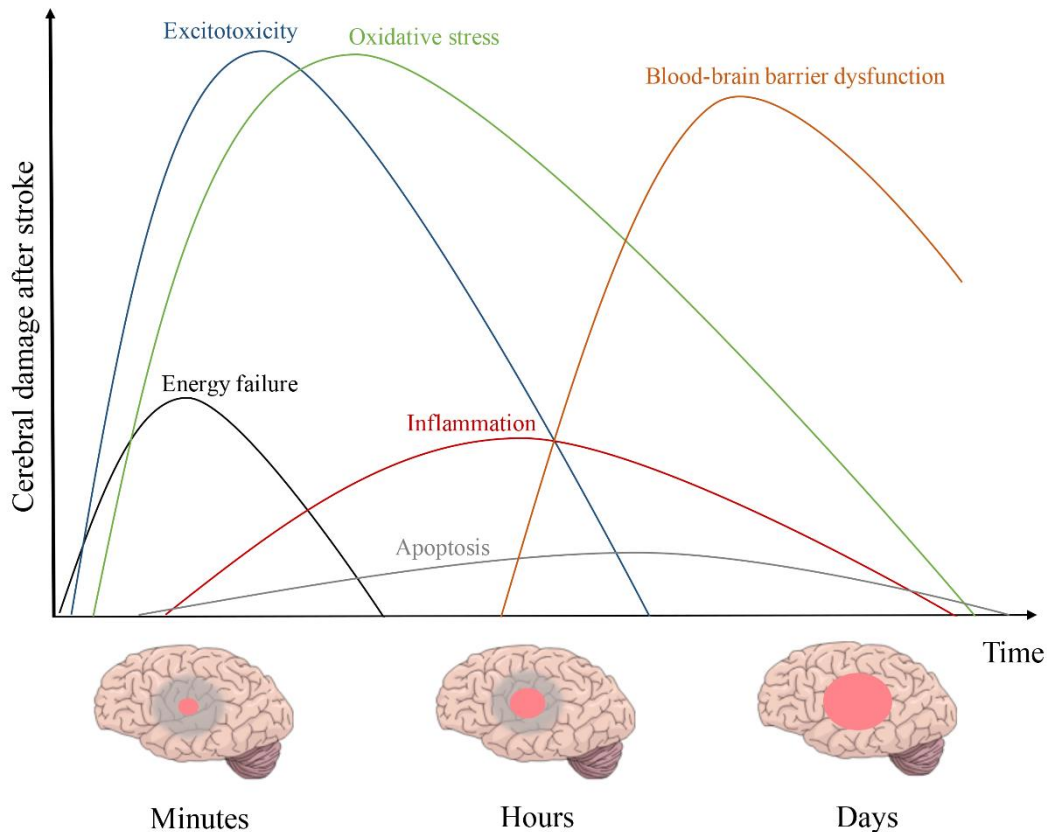


Figura 3: Danos cerebrais causados por um evento isquêmico em uma escala de tempo.

Logo após a isquemia, há falha energética, ocasionando excitotoxicidade e estresse oxidativo. Nos primeiros minutos, há a formação do core e da penumbra, onde se desenvolve a inflamação e apoptose celular que perduram por horas e até dias. Após algumas horas, a barreira hematoencefálica sofre danos e sua permeabilidade vascular é aumentada, facilitando a entrada de substâncias perigosas no cérebro. Todos os processos deletérios citados podem perdurar por dias, causando cada vez mais danos e morte celular. Retirado com permissão de Bruch et al, 2019.

1.2. Tratamentos existentes

Atualmente, somente alguns procedimentos são normalmente ofertados para melhorar a qualidade de vida do paciente acometido pelo AVE. Não há tratamento efetivo para o AVE isquêmico. No caso do AVE isquêmico duas medidas são adotadas.

As medidas aprovadas são a trombólise e a trombectomia. Sendo a principal forma de cuidado para o insulto isquêmico e única aprovada pela US FDA (Food and Drug Administration), a trombólise consta na intervenção farmacológica utilizando um ativador de plasminogênio tecidual, também chamado

de t-Pa (CHEN; GAO, 2017). Ele consegue dissolver o coágulo dos vasos cerebrais restaurando, assim, o fluxo sanguíneo, e resultando em proteção para o tecido cerebral isquemiado. Entretanto, este tratamento apresenta uma janela terapêutica eficaz muito limitada (4-5 horas após o insulto) e é a principal razão pela qual somente 7% dos pacientes elegíveis podem se beneficiar deste tratamento; além disso, há um aumento do risco de hemorragia intracerebral (CHEN; GAO, 2017; POWERS et al., 2018).

A trombectomia, por outro lado, é um processo cirúrgico que recupera mecanicamente o fluxo sanguíneo de artérias de grande calibre promovendo maior efeito de recanalização que a trombólise (CHAMORRO et al., 2016). Mesmo este procedimento mecânico apresentando mais vantagens que o farmacológico sozinho, infelizmente, não está disponível em todos os hospitais, reduzindo bastante a quantidade de pacientes que poderiam se beneficiar com o tratamento endovascular da trombectomia (HANKEY, 2017). Além disso, mesmo quando o processo é um sucesso instalando a reperfusão, ainda há possibilidade de os pacientes apresentarem sequelas que prejudicam a qualidade de vida, devido à própria reperfusão instalada gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) e dano tecidual (MANZANERO; SANTRO; ARUMUGAM, 2013).

Considerando as escassas possibilidades de tratamento para os pacientes, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de descobrir substâncias que possam ser neuroprotetoras durante em evento isquêmico, ou seja, que possam intervir nos mecanismos descritos acima e outros que desencadeiam a morte neuronal e conseqüentemente incapacita grande parte dos pacientes, levando à morte em alguns casos.

1.3. Estudos experimentais de neuroproteção durante um AVE

Diversos trabalhos focam nos mecanismos deletérios da isquemia para achar uma substância ou técnica que possa se tornar um tratamento para o AVE. Estudos que mostram a influência das ações das mitocôndrias, dos radicais livres, do glutamato, do estresse oxidativo, por exemplo (CHAMORRO et al., 2016; SUN et al., 2018; YANG; MUKDA; CHEN, 2018). Alguns trabalhos tiveram como alvo a via da excitotoxicidade, procurando por substâncias que pudessem servir como removedor (scavenger) do glutamato (CASTILLO et al., 2016), como moduladores das vias de sinalização do glutamato, como o influxo de cálcio (LIU et al., 2012); ou técnicas que pudessem acelerar a depuração do glutamato entre o cérebro e o sangue, como a diálise peritoneal (GODINO et al., 2013).

Em um modelo *in vitro* de cultura de células PC12, foi visto que o 6-O-galloyl paeoniflorin (GPF), advindo de um composto isolado da raiz da peônia, tem ações neuroprotetoras reduzindo estresse oxidativo, resposta inflamatória, dano celular e apoptose por ativação da via PI3K/Akt/Nrf2. Em modelo *in vivo* de isquemia/reperfusão em ratos, o tratamento com GPF diminuiu o volume de infarto e melhorou déficits neurológicos (WEN et al., 2018).

Um novo inibidor específico da via inflamatória JAK2-STAT3, o SC99, melhorou apoptose neuronal, degeneração e resposta inflamatória em um modelo de privação de oxigênio e glicose (OGD) em cultura primária de micróglia. Além disso, injeção intracerebroventricular de SC99, em ratos Sprague-Dawley em um modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO), melhorou déficits neurocomportamentais e edema cerebral (DING et al., 2018).

A superexpressão de Sirtuina 6 (SIRT6), membro da família sirtuina das desacetilases dependentes de NAD⁺ no cérebro pela transferência de genes in vivo, aumentou a sinalização antioxidante de NRF2 (fator nuclear eritroide 2), um importante regulador da resposta antioxidante do corpo, ocasionou a redução do estresse oxidativo e atenuação dano cerebral e déficits neurológicos em um modelo de isquemia/reperfusão (ZHANG et al., 2017b).

Não somente substâncias estão sendo estudados durante a isquemia. Às vezes, mudanças físicas podem fazer com que resultados promissores sejam encontrados. Em um estudo espanhol, usando um modelo de OGD em fatias cerebrais de ratos adultos, foi confirmado que a hipotermia leve protege contra a morte celular ao resfriar o tecido durante e depois do OGD, mas não quando a hipotermia é induzida apenas durante a reoxigenação (HERNÁNDEZ-GUILLAMON et al., 2014).

As células gliais também têm muita influência durante um insulto, e, portanto, são foco de alguns estudos. A formação de cicatriz glial resultante de excessiva astrogliose limita a regeneração axonal e prejudica a recuperação da função. Em um estudo realizado pelo grupo do professor Lyu, na China, foi avaliada a ação da carnosina, um dipeptídeo endógeno hidrossolúvel, utilizando um modelo de OGD em uma cultura primária de astrócitos de ratos. Eles puderam verificar que a carnosina suprime a migração dos astrócitos reativos. Além disso, ela melhorou o crescimento de neuritos de neurônios corticais em uma co-cultura com astrócitos sob condições isquêmicas (OU-YANG et al., 2018).

Como visto acima, muitas substâncias são estudadas com o objetivo de proteger o cérebro de um AVE através dos diversos mecanismos deletérios dos

insultos. Neste cenário, desde alguns anos atrás, um outro grupo de substâncias têm gerado interesse da comunidade científica: os peptídeos do sistema renina angiotensina (SRA).

1.4. Sistema Renina-Angiotensina

O SRA é um sistema classicamente ligado à homeostase da resistência periférica vascular, em outras palavras, da pressão arterial e do volume e composição eletrolítica dos fluídos corpóreos. O sistema tem uma via clássica composta pelo Angiotensinogênio, produzido pelo fígado, que é transformado em Angiotensina I (Ang I) pela renina, produzida pelos rins. A Ang I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em Angiotensina II (PEACH, 1977), que se ligando ao receptor AT1 tem ação vasoconstritora; enquanto que ligada ao receptor AT2, mesmo suas ações sendo menos conhecidas, há estudos que indicam funções contrárias às geradas pelo AT1, como cardioproteção (ZHANG et al., 2017a).

Por muitos anos, estes eram os peptídeos conhecidos da via. Até que a sua via alternativa for identificada, trazendo com ela diversos peptídeos gerados a partir da via clássica, como Ang A, Ang-(1-7) (SANTOS et al., 2003, 2013), Ang-(1-5) (YU et al., 2016), Ang-(1-9) (OCARANZA et al., 2010, 2014).

Os peptídeos da via alternativa, descritos como contra regulatórios às ações da via clássica ECA / Ang II / AT1, (ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014) estão sendo largamente estudados no sistema cardiovascular, sendo suas ações anti-inflamatórias, anti-fibróticas, anti-hipertensivas e vasodilatadoras as mais conhecidas (DE MORAES et al., 2017; LIU; SHI; SUMNERS, 2016; MENG et al., 2014; SKIBA et al., 2017; YU et al., 2016). Alguns estudos têm mostrado que

alguns destes peptídeos têm ações durante a isquemia cardíaca (MENDOZA-TORRES et al., 2018; PARK et al., 2018).

Uma das substâncias que vem sendo estudada e mostrado ações importantes e protetoras durante a isquemia cerebral é a Angiotensina-(1-7) (BENNION et al., 2015; JIANG et al., 2012; JIANG; GAO; ZHANG, 2013; MECCA et al., 2011). Em 2011, usando endotelina no cérebro de ratos, Mecca e colaboradores apresentaram dados mostrando que a Ang-(1-7) tem ações importantes sobre a isquemia cerebral, diminuindo significativamente a área infartada e os déficits neurológicos medidos 72 horas após o insulto (MECCA et al., 2011).

A partir destes dados, começou a ficar bem claro que os peptídeos da via alternativa da SRA têm grande potencial para diminuir os efeitos deletérios das principais doenças que afetam o ser humano; neste trabalho, dando enfoque aos trabalhos desenvolvidos com modelos de AVE. Com isso, é importante dizer que há alguns anos, outro peptídeo foi identificado pelo grupo do professor Robson Augusto Souza Santos, do Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Minas Gerais, a alamandina. (Figura 4).

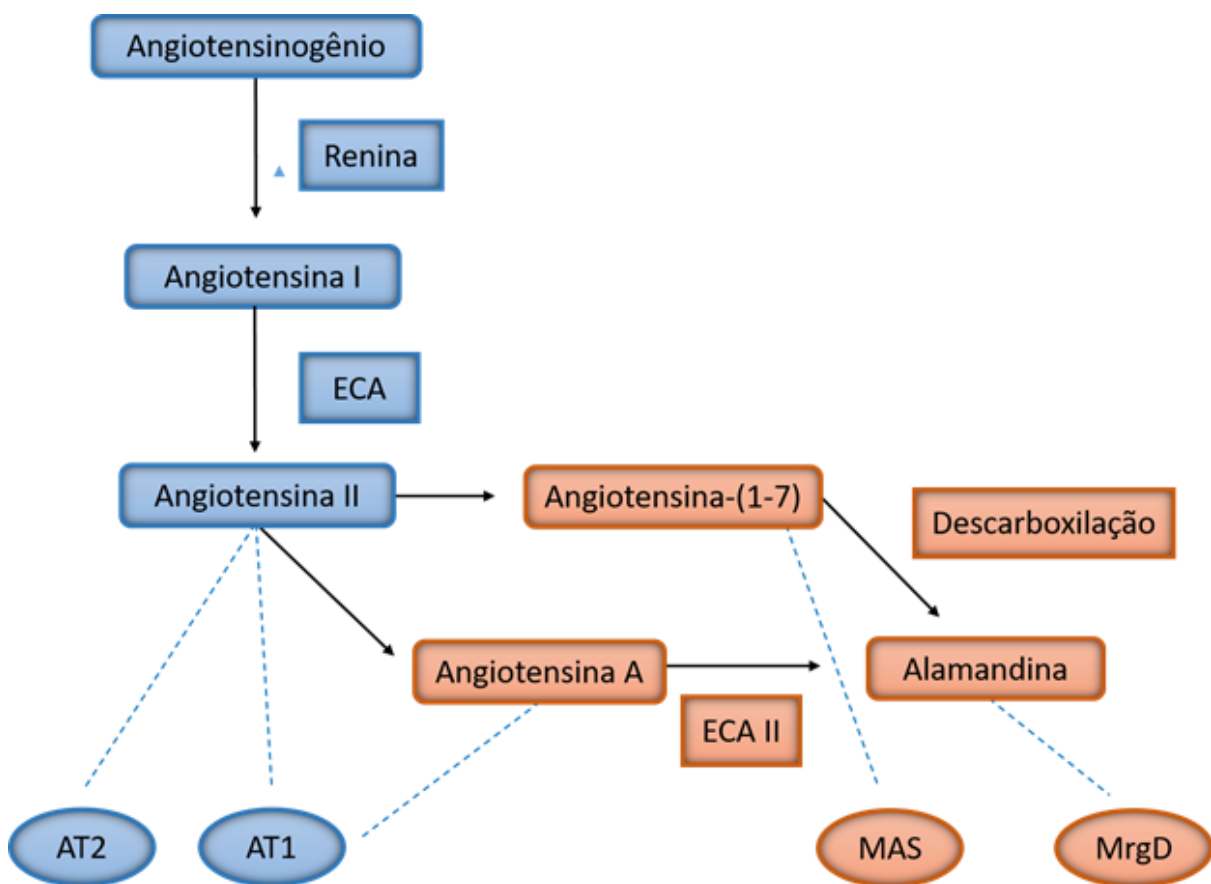


Figura 4: Cascata do sistema renina angiotensina composta pela via clássica e pela via alternativa.

Esquema representando a cascata da SRA composta pelos peptídeos, enzimas e receptores da via clássica (em azul) e da via alternativa (em marrom). A partir da Angiotensina II, que atua se ligando em seus receptores AT1 e AT2, há a formação da Angiotensina-(1-7), que se liga ao receptor Mas, e da Angiotensina A, que se liga ao AT1. A partir destes peptídeos, por descarboxilação ou pela ECA II, respectivamente, forma-se a alamandina que atua através do receptor MrgD. Adaptado de Etelvino et al, 2014.

1.4.1 Alamandina: o novo peptídeo e seus estudos

A partir dos conhecimentos explicados anteriormente, a alamandina aparece no SRA como uma nova substância a ser estudada e entendida. Não há muitos estudos de suas ações no SNC, e suas funções em outros sistemas do corpo vêm sendo foco de análises e muitos estudos vêm trazendo resultados bem interessantes.

A alamandina (Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) foi identificada e caracterizada, em tecido cardíaco de ratos e no plasma humano, pela primeira vez no ano de 2013 pelo grupo do professor Robson Santos, da Universidade Federal de Minas Gerais (LAUTNER et al., 2013). Ela é um peptídeo endógeno que pode ser formado por duas vias diferentes; por hidrólise catalítica do octapeptídeo Angiotensina A pela ECA II ou por descarboxilação do resíduo de aminoácido Asp (*aspartato*) que compõe a angiotensina-(1-7), levando à formação do resíduo Ala (alanina) como o aminoácido N-terminal (ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014; MENDOZA-TORRES et al., 2015; VILLELA; PASSOS-SILVA; SANTOS, 2014) (Figura 5).

É importante salientar que as ações da alamandina que estão sendo descobertas até agora mostram grande similaridade com sua precursora Ang-(1-7), como efeito pressor e depressor no cérebro, liberação de óxido nítrico (NO), efeito anti-hipertensivo e anti fibrótico (ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014), vasodilatação por ativação da via de óxido nítrico no endotélio, mesmo suas ações sendo realizadas em diferentes receptores (QARADAKHI; APOSTOLOPOULOS; ZULLI, 2016).

No sistema endócrino, a alamandina, agindo em seu receptor MrgD, é capaz de suprimir a expressão e secreção de leptina no tecido adiposo e nos adipócitos isolados de ratos Wistar, assim como em seu nível sérico (UCHIYAMA et al., 2017) .

No sistema cardiovascular, sistema que está sendo foco da maioria destas pesquisas, há estudos em diversos modelos e diferentes hipóteses.

Foi visto que a alamandina atenua a hipertensão, visto que houve diminuição da diástole, sístole e pressão arterial média de ratos espontaneamente hipertensos (SHR); além disso, quando em cultura celular de cardiomiócitos tratados com angiotensina II, a alamandina também demonstrou atenuação de hipertrofia cardíaca (LIU et al., 2018). Complementando estes resultados, foi analisada a via pela qual a alamandina atenuava os efeitos hipertensivos e foi visto que é pela ativação da AMPK/NO induzida pela ação da alamandina em seu receptor MrgD (JESUS et al., 2018).

Através do mesmo mecanismo dos estudos citados acima, a alamandina conseguiu reverter a disfunção vascular induzida por hiperhomocisteinemia na aorta abdominal de coelhos brancos da Nova Zelândia (QARADAKHI et al., 2017).

Em um estudo com camundongos implantados com um dispositivo que altera a tensão de cisalhamento do sangue e induz diferentes fenótipos de placas carotídeas, a alamandina anulou a degranulação de neutrófilos, diminuindo os produtos liberados por grânulos de neutrófilos durante aterosclerose. Ela não interferiu no teor de lipídeos, macrófagos, neutrófilos ou colágenos contidos nas placas carotídeas e na aorta (DA SILVA et al., 2017).

Em camundongos 2K1C hipertensos, a alamandina causou um leve aumento da pressão arterial média e da pressão sistólica do ventrículo esquerdo; o que foi seguido de diminuição destes parâmetros ao longo da reperfusão. Bloqueando o receptor AT1, o efeito foi abolido, e bloqueando os receptores AT2 e MrgD, parcialmente diminuído. Este estudo pode mostrar que em condições normais, a alamandina atua por AT1, mas em condições patológicas, como

hipertensão, suas ações nos receptores AT2 e MrgD mascaram seu efeito sobre o receptor AT1 (HEKMAT et al., 2017).

Em um experimento utilizando cardiomiócitos de ratos neonatais em um modelo de disfunção cardíaca associada à sepse, a alamandina diminuiu a disfunção cardíaca induzida por lipopolissacarídeo (LPS) resultando em um aumento da contratilidade do coração e diminuição da inflamação, autofagia e apoptose. Além disso, ela também atenua a sepse induzida por LPS inibindo a ativação da via de sinalização da proteína quinase (MAPK) (LI et al., 2018).

Com o objetivo de determinar o papel da alamandina e da Angiotensina A em aortas doentes, foram usados coelhos brancos da Nova Zelândia. Para isso, avaliaram as artérias torácica, renal, carótida, ilíaca e abdominal. A alamandina melhorou a vasodilatação mediada por acetilcolina na aorta torácica e na artéria ilíaca, e diminuiu na artéria renal. A alamandina também diminuiu vasoconstrição mediada pela Angiotensina A. Ambos peptídeos apresentam redução de vasoatividade durante uma aterogênese (HABIYAKARE et al., 2014).

Em um estudo europeu, utilizando células endoteliais da veia umbilical de humanos, foi identificado que a alamandina estimula a formação do segundo mensageiro cAMP através do seu receptor funcional MrgD e considera, portanto, que o cAMP é uma ferramenta ideal para quantificar mudanças na sinalização intracelular mediada pela alamandina. Este estudo demonstra que a alamandina também poderia ligar-se no receptor Mas devido à orientação D da *alanina* na posição 7, o que pode impedir o encaixe do peptídeo no receptor MrgD, enquanto ele ainda se encaixa no Mas e, assim, antagoniza os efeitos do agonista lá; tudo

isso levando a mudanças significativas na farmacodinâmica (TETZNER et al., 2018).

Em alguns casos, a alamandina já está sendo testada em seres humanos. Em um estudo com humanos e um modelo de diabetes em ratos (Akita), a alamandina impacta benéficamente a migração de células CD34+ disfuncionais de diabéticos com rinopatia. O estudo enfatiza que esta descoberta representa uma possível estratégia terapêutica para prevenção de rinopatia diabética (DUAN et al., 2018).

Em um modelo de isquemia cardíaca, os danos causados pela reperfusão foram analisados em ratos Sprague-Dawley, sendo observado que a alamandina foi capaz de diminuir a área infartada, diminuir os níveis de lactato desidrogenase (marcador de dano celular), a expressão de proteínas apoptóticas, além de aumentar o fluxo coronário e a expressão de proteínas antioxidantes, demonstrando efeitos cardioprotetores e sendo sua ação realizada pela ativação de seu receptor MrgD (PARK et al., 2018).

Como pode ser visto, a alamandina vem sendo estudada nos mais diversos modelos e nos mais diversos sistemas do corpo. O importante é saber mais sobre as ações deste peptídeo no SNC. Até agora, poucos artigos mostram sua ação neste sistema.

Um dos primeiros estudos analisou a administração de alamandina no núcleo paraventricular do hipotálamo, centro do controle da pressão arterial. Através de micro injeção intraestrutura, a pressão arterial e atividade simpática do nervo renal foram analisadas. Foi verificado que a alamandina aumenta a pressão arterial e o fluxo simpático de ratos espontaneamente hipertensos via seu receptor

MrgD e o pré-tratamento com AMPc melhorou os efeitos da alamandina (SHEN et al., 2018). O que se mostrou muito interessante é sua ação contrária à mostrada na periferia.

Também através de microinjeção de alamandina, mas no bulbo ventrolateral caudal de ratos 2K1C, houve efeito hipotensivo em ratos Sham operados. Em relação à média de pressão arterial nos animais 2K1C, os que receberam a maior dose de alamandina obtiveram o mesmo resultado dos salinas. Quando avaliadas suas ações nos receptores, os antagonistas de MrgD e AT1 conseguiram antagonizar o efeito hipotensivo da alamandina (SOARES et al., 2017).



Figura 5: Imagem representativa do peptídeo alamandina.

Nesta imagem pode-se ver a representação dos 7 resíduos de aminoácido que compõem o heptapeptídeo alamandina, com destaque, em roxo, para a alanina, resíduo que o difere de sua precursora Ang-(1-7). Ligados ao peptídeo pode-se ver uma amina e um ácido carboxílico. Retirado com permissão de Hrenak et al, 2016.

1.4.2 O receptor MrgD

Juntamente com a descoberta da alamandina, também foi encontrado seu receptor MrgD (receptor Mas relacionado ao receptor acoplado à proteína G) sendo caracterizado por fluorescência através de microscopia confocal (LAUTNER et al., 2013). Portanto, foi visto que a alamandina não atua pelo mesmo receptor de sua precursora Ang-(1-7), o Mas.

Os Mrg são uma família de receptores GPCR (receptores acoplados a proteína G) relacionada ao receptor Mas (YOUNG et al., 1986). Parte dos genes do MrgD são especificamente expressos em neurônios sensoriais de lectina IB4+

de Griffonia simplicifolia, uma subpopulação de nociceptores cutâneos que estariam implicados em dor neuropática (MALMBERG et al., 1997), portanto acreditava-se serem somente estas suas funções.

Panula et al foram os primeiros a sugerir em um trabalho que estes receptores estariam ligados a neuropeptídios que estariam modulando a sensação de dor e analgesia por morfina em condições normais e patológicas através do cérebro e da medula espinal (PANULA et al., 1999).

A partir destes primeiros achados, outros estudos foram realizados com os peptídeos do SRA. Foi descoberto que a Ang-(1-7) é um agonista fraco deste receptor em um estudo com células COS ou HEK293 transfectadas com uma variedade de receptores Mrg e investigada a liberação de ácido araquidônico (AA) e a ativação transcricional através da ativação do fator de resposta sérico (SRF) após estimulação. Neste estudo foi observada a existência de um receptor endógeno para a Ang-(1-7) sensível a A-779, o antagonista do receptor Mas (GEMBARDT et al., 2008).

Com estes dados, alguns estudos começaram a avaliar a ação da alamandina pelo receptor MrgD, que quando antagonizado, abolia as ações encontradas (HEKMAT et al., 2017; SHEN et al., 2018; SOARES et al., 2017; UCHIYAMA et al., 2017).

Mesmo já tendo sido apresentados vários estudos do peptídeo em diversos sistemas e sua relação com seu receptor, pela falta de estudos no sistema nervoso central e principalmente, a inexistência até o momento de estudos em um modelo de isquemia cerebral, faz-se necessário entender as ações da alamandina

durante um AVE e como ela atua nos mecanismos deletérios de uma isquemia cerebral.

“ Se as circunstâncias atuais da sociedade não admitem o desenvolvimento livre das mulheres, então a sociedade precisa ser remodelada. ”
Elizabeth Blackwell

2 JUSTIFICATIVA

O acidente vascular encefálico é uma das principais causas de incapacidade e morte no Brasil e no mundo. Os tratamentos existentes para o AVE isquêmico são poucos e uma pequena parcela dos pacientes é elegível. Por esta razão, estudos são necessários para diminuir as sequelas dos pacientes, tendo como foco substâncias que interfiram nos processos isquêmicos, como o dano celular, sinalização glutamatérgica e morte celular.

Muitas substâncias estão sendo estudadas e suas ações avaliadas durante uma isquemia com o intuito de descobrir seus mecanismos de ação e como podem ajudar na diminuição das respostas isquêmicas. Os peptídeos do SRA estão se destacando como possíveis neuroprotetores, já tendo estudos *in vitro* e *in vivo* com a angiotensina-(1-7), pertencente à via alternativa do eixo, mostrando diminuição do volume de infarto (MECCA et al., 2011).

Há alguns anos, foi descoberto que a partir da angiotensina-(1-7) é gerada a alamandina, um peptídeo que agindo pelo seu receptor MrgD já mostrou ações benéficas em diversos sistemas como cardiovascular, renal, endócrino. No SNC ainda há poucos estudos, porém nenhum em um modelo de isquemia. Por esta razão, é importante avaliar as ações que deste novo peptídeo em um modelo de isquemia cerebral *in vitro* para determinação de sua influência nos processos isquêmicos.

“ Não há alegria mais intensa que a de encontrar um fato que não pode ser entendido nos termos das ideias atualmente aceitas. ”

Cecilia Payne-Gaposchkin

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a possível ação neuroprotetora da alamandina em fatias hipocámpais de camundongos submetidas à isquemia *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a curva concentração x resposta neuroprotetora para a alamandina, em fatias hipocámpais de animais submetidos à isquemia *in vitro* durante o período de isquemia e de reperfusão

Em perfusatos de hipocampus de animais submetidos ou não à isquemia *in vitro* (protocolo OGD):

- ✓ Analisar o dano celular
- ✓ Avaliar a liberação de glutamato no meio de incubação
- ✓ Analisar a ação da alamandina no receptor MrgD

Em fatias hipocámpais de animais submetidos ou não à isquemia *in vitro* (protocolo OGD):

- ✓ Avaliar a morte celular

“ Quando você tem essa alegria, você faz os experimentos certos. Você deixa que o material lhe diga aonde ir, e ele lhe diz, a cada passo, qual deve ser o próximo. ”

4.1. Métodos

4.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57/Bl6, de 8 a 12 semanas de idade provenientes do Biotério Central da UFMG. Eles foram alocados em gaiolas no Biotério de Experimentação Exclusivo para camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG, onde receberam alimentação com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água “*ad libitum*” em temperatura controlada de +/- 25°C e foto período de 12h claro/escuro. Todos os experimentos foram realizados após aprovação do comitê de ética pelo número CEUA: 174/2014.

4.1.2 Equipamentos

Tabela 2: lista de equipamentos utilizados nos experimentos

Nome	Modelo / Marca
Agitador	TE - 089 / Tecnal®
Balança eletrônica com precisão decimal	BG 440 / Gehaka ^{LTDA}
Banho-maria com agitação	BT-25 / Yamato ^{LTD}
Centrífuga	5415 R / Eppendorf
Espectrofotômetro	Multiskan GO / Thermo Fisher Scientific
Fatiador de tecidos	Tissue Chopper / Mcllwain™ Brinkmann Instruments, England
Fluorímetro	Synergy 2 / Biotek®
Homogeneizador de tecidos	z359971-1EA / Sigma-Aldrich®
Lâminas	ImmunoSlide / EasyPath
Lamínulas	Global Glass
Microscópio de fluorescência	Axio Imager.M2 / Carl Zeiss
pHmetro digital	PG1800 / Gehaka ^{LTDA}

4.1.3 Soluções

Tabela 3: lista de soluções utilizadas nos experimentos

Soluções	Composição (mM)
ACSF pré-incubação	Cloreto de Sódio (NaCl) – 120 Cloreto de Potássio (KCl) – 2 Fosfato Ácido de Potássio (KH ₂ PO ₄) – 1,18 Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) – 10 Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) – 0,5 Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) – 26 Glicose – 11 pH = 7,4 ajustado com HCl 3M H ₂ O Volume = 1 litro
ACSF com glicose	Cloreto de Sódio (NaCl) – 120 Cloreto de Potássio (KCl) – 2 Fosfato Ácido de Potássio (KH ₂ PO ₄) – 1,18 Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) – 1,19 Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) – 2 Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) – 26 Glicose – 11 pH = 7,4 ajustado com HCl 3M H ₂ O Volume = 1 litro
ACSF sem glicose	Cloreto de Sódio (NaCl) – 120 Cloreto de Potássio (KCl) – 2 Fosfato Ácido de Potássio (KH ₂ PO ₄) – 1,18 Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) – 1,19 Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) – 2 Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) – 26 pH = 7,4 ajustado com HCl 3M H ₂ O Volume = 1 litro
BSA	Soro de albumina bovina (1mg/ml) H ₂ O
Bradford	Azul de Coomassie – 0,05g Metanol – 50ml Ácido fosfórico – 0,1litros H ₂ O Volume = 1 litro
KREBS-RINGER-HEPES (KRH)	NaCl – 124 KCl – 4 MgSO ₄ – 1,2 Glicose – 10 HEPES – 25 H ₂ O pH=7,4, ajustado com NaOH 10M Volume = 0,1litros
Glutamato padrão	L - Glutamic Acid – 1 H ₂ O
Solução de NADP ⁺	NADP ⁺ - 600 H ₂ O
PARAFORMALDEÍDO 4% BUFFER 0,1M	NaOH – 100 Tampão fosfato 200 pH ajustado com HCl 1M
Tampão de lise	Tris-base – 0,74g NaCl - 0,9g NP-40 10% - 0,01litros Deoxicolato de sódio – 0,0025litros EDTA – 100 H ₂ O Volume = 0,1litros

4.1.4 Reagentes

Tabela 4: lista dos reagentes utilizados nos experimentos

Reagentes	Código - Fabricante
Ácido glutâmico 99%	G1251 - Sigma-Aldrich®
Dinucleótido de nicotinamida e adenina hidratado (NAD ⁺)	N1511 - Sigma-Aldrich®
Glutamato Desidrogenase (GDH)	G2626 - Sigma-Aldrich®
Kit LDH	Quibasa / Bioclin
<i>Live/Dead Viability/Citotoxicity Kit for mammalian cells</i>	Molecular Probes Inc., USA

4.1.5 Preparação do tecido cerebral

Os animais foram eutanasiados rapidamente por deslocamento cervical, o cérebro foi retirado, colocado em uma solução de ACSF pré-incubação a 4°C previamente aerada com uma mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂. Em seguida, o hipocampo foi dissecado em uma placa de Petri invertida em uma superfície gelada e fatiado na espessura de 400µm usando um fatiador de tecidos (McIlwain™ Brinkmann Instruments).

4.1.6 Privação de oxigênio e glicose (OGD) – modelo de insulto isquêmico *in vitro*

As fatias hipocampais foram separadas aleatoriamente em dois grupos, controle (nOGD) e isquemia (OGD), sendo colocadas em poços contendo 500µl de solução ACSF pré-incubação e aeradas com mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂ por 90 minutos, sendo incubadas a 34°C, que foi dividido em dois períodos de 45 minutos para troca dos meios.

Após o período de pré-incubação, os meios foram retirados e descartados. Na placa nOGD foi colocado ACSF com glicose e aerada por mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂, enquanto a placa OGD continha ACSF sem glicose e aerada por mistura gasosa contendo 95% N₂ e 5% CO₂. Em ambas placas foram criados os grupos controles e os grupos com alamandina e foram colocados 500µl de aCSF com/sem glicose. As duas placas foram incubadas por 60 minutos. Começa o período de isquemia.

Em seguida, os meios foram retirados e coletados em eppendorfs de 500µl, e substituídos em ambas placas por ACSF com glicose nos poços dos controles, com diluições da alamandina nas diferentes concentrações e aerados novamente com mistura carbogênica. A incubação também dura 60 minutos. Começa o período de reperfusão.

Com o término do período de reperfusão, os meios foram coletados e foi dosada a liberação de lactato desidrogenase para avaliar o dano celular; o tecido dos poços foi retirado com solução RIPA para posterior dosagem de proteínas e normalização.

4.1.7 Curva dose x resposta

Com o objetivo de gerar uma curva dose x resposta, as concentrações de alamandina 0.01nM, 0.1nM, 1nM, 10nM e 100nM foram escolhidas. Foi utilizado o protocolo de isquemia acima detalhado e nos poços com alamandina foi colocada uma solução de 500µl de alamandina diluída em aCSF com/sem glicose dependendo do grupo.

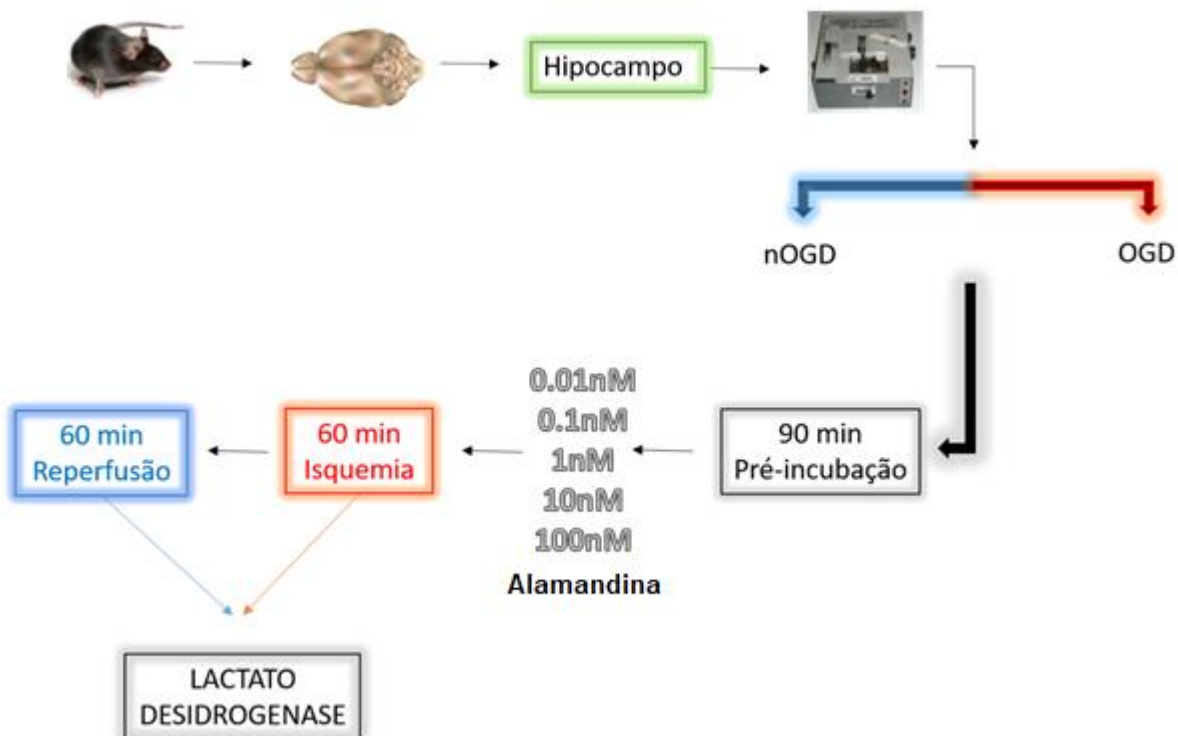


Figura 6: Delineamento experimental da curva dose x resposta da alamandina.

4.1.8 Antagonistas

Para determinação do papel do receptor MrgD durante uma isquemia cerebral, o mesmo protocolo de privação de oxigênio e glicose foi realizado, mudando os grupos das placas nOGD e OGD. No período de isquemia, foram adicionados aos meios 5 μ L de solução a 100nM da alamandina resultando em 1nM no poço. O antagonista do receptor MrgD, d-Pro, foi utilizado em concentração 5 vezes maior que a concentração de alamandina (5nM) (LAUTNER et al., 2013). É importante enfatizar que o antagonista foi colocado 10 minutos antes das soluções de alamandina com o objetivo de antagonizar os receptores.

Os meios foram coletados e substituídos somente pelo aCSF com glicose e colocado na reperfusão como descrito anteriormente. Os próximos passos seguem o protocolo de privação de oxigênio e glicose.

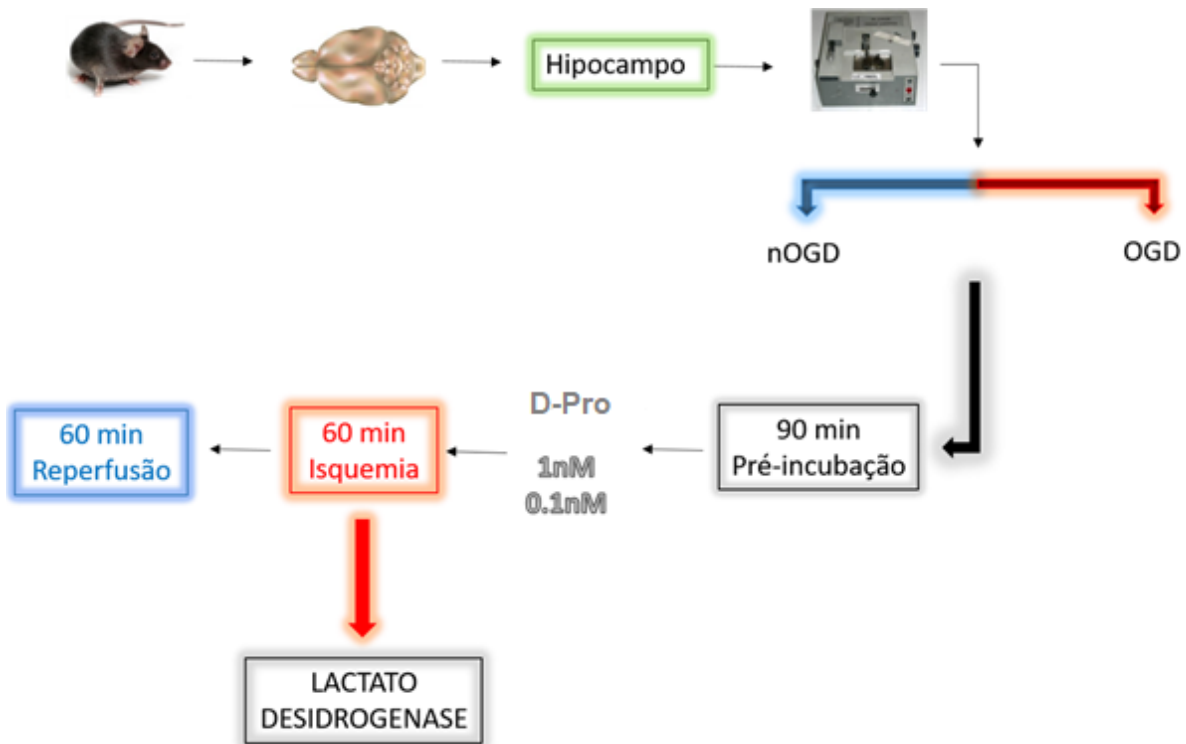


Figura 7: Delineamento experimental para avaliação da ação dos antagonistas.

4.1.9 Ensaio para quantificação de lactato desidrogenase liberada

Para determinação da viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de lactato desidrogenase. O LDH é uma enzima citosólica, encontrada entre os organismos vertebrados, que faz parte do metabolismo glicossítico, sendo responsável pela formação de lactato quando em situação de falta de oxigênio. Ela catalisa a oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) com piruvato ou reduz dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD) e lactato através da seguinte reação colorimétrica (MARKERT, 1984).



O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o kit LDH (Bioclin, Brasil) em que foram utilizados 8µl do sobrenadante dos meios controle e isquemia para determinação da concentração catalítica, em uma leitura cinética, a uma absorvância de 340nm, conforme descrito no kit. Foi utilizada uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan GO).

4.1.10 Dosagem de proteínas

Para dosagem das proteínas, foi utilizada solução de Bradford.

O ensaio colorimétrico é determinado pela ligação do Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. A ligação do corante à proteína causa uma mudança na absorção máxima do corante na faixa de 465nm a 595nm (BRADFORD, 1976). O aumento da absorção a 595 nm foi monitorado e avaliado no espectrofotômetro (Multiskan GO).

4.1.11 Ensaio para quantificação do glutamato liberado

A liberação de glutamato no sobrenadante das amostras é mensurada através da reação entre NAD⁺ e glutamato desidrogenase (GDH), resultando no aumento da fluorescência pela produção de NADH⁺ (NICHOLLS; SIHRA; SANCHEZ-PRIETO, 1987). O ensaio foi realizado em solução KRH (solução de Krebs-Henseilt) (180 uL) com a adição de NAD⁺ (40nM) e 150 uL de amostra incubado a 37°C. Quando esta solução é excitada por uma luz em um comprimento de onda de 340 nm, emite uma fluorescência que pode ser detectada e quantificada em um comprimento de onda de 440 nM por um

fluorímetro (Synergy 2) (LEITE et al., 2012; MASSENSINI et al., 1998; NICHOLLS; SIHRA; SANCHEZ-PRIETO, 1987).

Em triplicata, o background de fluorescência foi determinado e subtraído dos valores encontrados, através da leitura de NAD⁺ e GDH junto ao tampão KRH. Para quantificação final e criação de uma curva padrão, foi utilizado 6 uL de um padrão interno de glutamato (6 nmol/uL), como referência. A normalização foi realizada através da quantificação de proteínas totais das amostras das fatias hipocâmpais previamente homogeneizadas, como citado anteriormente (BRADFORD, 1976).

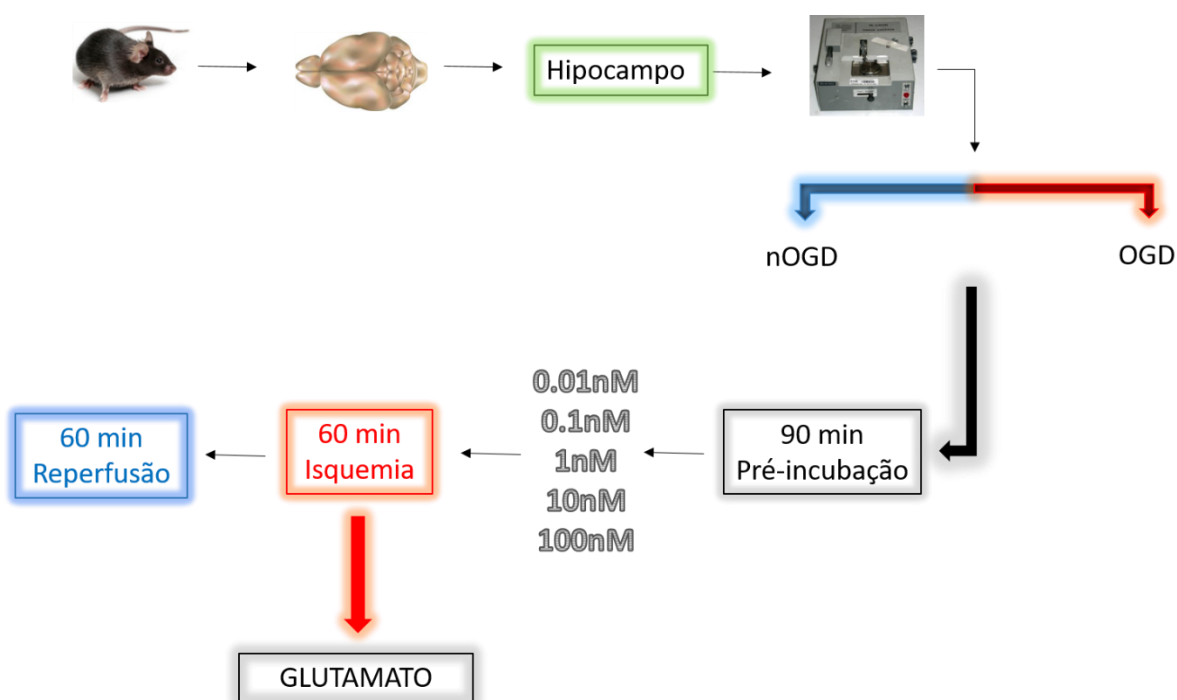


Figura 8: Delineamento experimental para determinação da liberação de glutamato.

4.1.12 Ensaio para quantificação de morte / viabilidade celular

Para quantificação da morte celular foi utilizado o mesmo protocolo de privação de glicose e oxigênio descrito anteriormente, com a diferença do tempo de reperfusão, aumentada para 2 horas e não guardar os meios para posterior análises; este ensaio é de marcação de células mortas por fluorescência, portanto, utiliza-se o tecido hipocampal. Neste experimento, cada animal foi controle dele mesmo.

MARCAÇÃO DO TECIDO

Após o período de 2 horas de reperfusão, os meios foram descartados e substituídos por 500µl de aCSF com glicose aerado anteriormente com O₂ e CO₂ onde foram incubadas com 1,5 µl de Etídio-Homodímero (2mM). Para a marcação das células foi utilizado o Etídio-Homodímero (Eth-D-1) do kit Live/Dead – Viability/Citotoxicity Kit – Molecular Probes Inc., USA, que permite a avaliação de alterações químicas e físicas em células com membrana danificada. Após o insulto isquêmico, há perda de integridade e aumento da permeabilidade da membrana, possibilitando, assim, a entrada do marcador que, interagindo com ácidos nucleicos, colore de vermelho o núcleo de células mortas (MONETTE et al., 1998).

As placas foram incubadas por 30 minutos protegidos da luz à temperatura de 34°C. Em seguida, a solução foi retirada e as fatias foram lavadas com 500 µl de aCSF com glicose, previamente oxigenado, 2 vezes por 15 minutos cada. Depois, as fatias foram fixadas em 500 µl de paraformaldeído a 4% por 15 minutos.

As fatias foram retiradas dos poços da placa e, de cada poço, foram montadas lâminas com glicerol, sobrepostas com lamínulas.

AQUISIÇÃO DAS IMAGENS E IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS MARCADAS

Após montagem, as lâminas foram levadas ao microscópio de fluorescência (Axio Imager.M2 – Zeiss) para que as fotos do hipocampo fossem tiradas. A região de CA1 foi escolhida e o tempo de exposição foi automaticamente calculado. Foi determinado o valor de 528nm de excitação e 617nm de emissão.

QUANTIFICAÇÃO DAS IMAGENS

As imagens foram abertas no programa *ImageJ* com o objetivo de quantificar as células mortas das fotos tiradas no microscópio. As imagens foram transformadas para 8bits, foi retirado o background e todos os parâmetros setados comparando com o grupo nOGD não tratado. O limiar basal de fluorescência foi determinado através dos respectivos histogramas e a quantidade de células mortas foi quantificada, diretamente relacionando-se a intensidade de pixels e calculando a densidade integrada. Quanto maior quantidade de células marcadas, maior a densidade de morte celular.

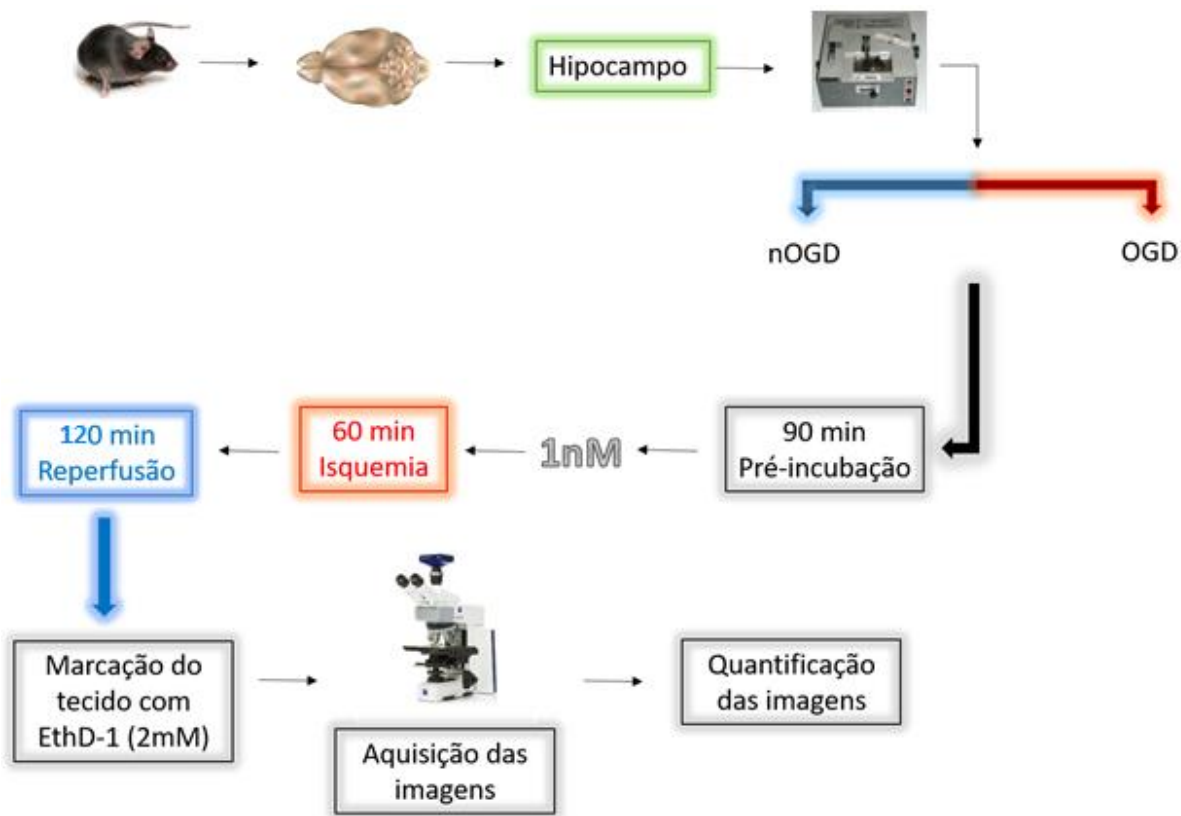


Figura 9: Delineamento experimental para avaliação da viabilidade celular.

4.1.13 Análise estatística

Para as análises estatísticas utilizou-se o teste de Two-way ANOVA, Tukey post-hoc e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. O programa utilizado para as análises estatísticas e elaboração dos gráficos foi o GraphPadPrism 5 ®. Os resultados estão apresentados como média e erro padrão da média.

“ A imaginação é a faculdade da descoberta, predominantemente. É ela que penetra nos mundos invisíveis que nos rodeiam, nos mundos da ciência. ”

Ada Lovelace

5 RESULTADOS

5.1. PERÍODO DA ISQUEMIA

Curva concentração x resposta

O primeiro passo foi criar uma curva concentração x resposta de neuroproteção hipocampal no modelo de privação de oxigênio e glicose e foram escolhidas as concentrações de 0.01nM, 0.1nM, 1nM, 10nM e 100nM. A partir da leitura de LDH liberado pelas células do meio, observou-se um padrão da curva em forma de U, como pode ser visto na figura 10.

Neste gráfico formado, em que o eixo x representa os grupos que passaram pelas condições escolhidas (sem / com isquemia; sem / tratamento com alamandina) e o eixo y representa a liberação de LDH em U/g de proteína, primeiramente pode ser analisada a primeira condição: submissão ou não ao protocolo de isquemia. Os grupos que não passaram pela privação são chamados nOGD e os que passaram pela privação são chamados OGD. Ao longo de toda a apresentação estes dados serão representados da seguinte maneira: as barras que representam o grupo nOGD estarão em rosa claro e as barras em vermelho são os grupos OGD.

Quando analisada a primeira dupla de barras (sem tratamento) pode ser visto que o grupo OGD apresentou uma quantidade de LDH liberado significativamente maior que o grupo nOGD, mostrando o efeito do protocolo isquêmico ($F [5, 146] = 5.984; P < 0.0001$). Quando avaliados os grupos que receberam tratamento, somente o grupo que recebeu a concentração de 1nM de alamandina mostrou diferença estatística de liberação de LDH quando avaliada a condição de protocolo isquêmico ($p > 0.9999$). As outras concentrações (0.01nM,

0.1nM, 10nM e 100nM) não mostraram diferença estatística quando comparados no protocolo isquêmico.

Quando avaliada a condição tratamento, somente o grupo OGD que recebeu a concentração de 1nM foi capaz de gerar uma liberação de LDH estatisticamente menor que o grupo OGD ($p=0.0010$). Este grupo mostrou proteção contra os danos causados pelo protocolo.

É importante salientar que comparando todos os grupos nOGD, nenhum grupo tratado com alamandina mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo controle nOGD.

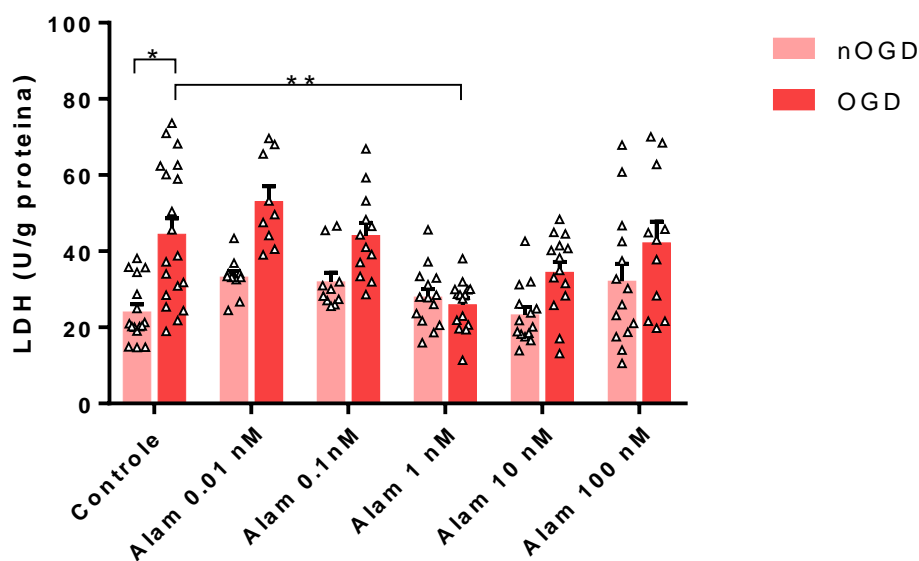


Figura 10: Curva dose resposta da alamandina durante o período de isquemia em fatias hipocâmpais de camundongos submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.

O gráfico mostra a liberação de lactato desidrogenase (LDH), que mostra o dano celular em U/g de proteína, durante a isquemia em um modelo de OGD. Foram usadas as concentrações de 0.01nM, 0.1nM, 1nM, 10nM e 100nM. Os dados são mostrados com média \pm SEM. Two-way ANOVA, post-hoc Tukey * $p=0.0001$ comparado com o controle e ** $p=0.001$ comparado com grupo OGD ($n= 11-19$).

Antagonismo do receptor específico da alamandina

Sabendo-se que a concentração de 1nM de alamandina é capaz de proteger as fatias hipocampais dos danos causados pelo protocolo isquêmico, o próximo passo foi avaliar a ação da alamandina no seu receptor específico, MrgD e seu antagonista, d-Pro.

Seguindo as mesmas convenções descritas no gráfico anterior, foi possível verificar, na figura 11 que, antagonizando o MrgD ocorre a perda do efeito de proteção gerado pela alamandina. Isso pode ser visto quando comparamos os grupos OGD Alam 1nM x OGD Alam 1nM + d-Pro ($F [1, 76] = 25.18; p < 0.0001$).

Analisando a condição do protocolo de isquemia entre os grupos tratados com alamandina que receberam o antagonista pode-se perceber que a alamandina interfere no processo isquêmico, uma vez que houve diferença estatística entre os nOGD e OGD ($p = 0.0003$).

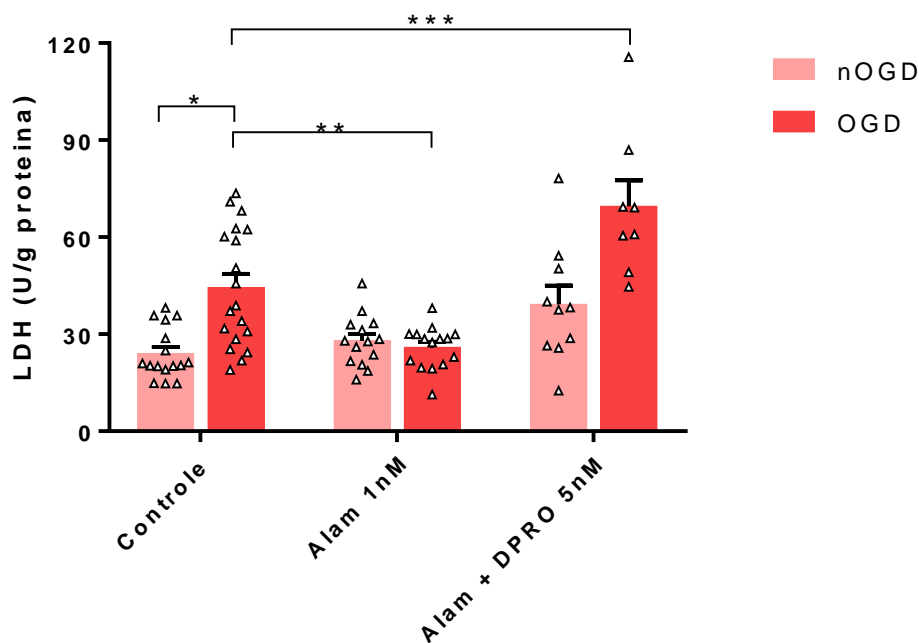


Figura 11: Ação do antagonista do receptor MrgD, o D-Pro, na concentração de 5nM em fatias hipocampais submetidas a privação de oxigênio e glicose

O gráfico mostra a ação do antagonista d-Pro quando comparado com a concentração 1nM, que se mostrou protetora, em fatias hipocâmpais em um modelo de privação de oxigênio e glicose. Foi usada a concentração de 5nM de antagonista. Os dados são expressos como média± SEM. Two-way ANOVA, post-hoc Tukey. * p=0.003 comparando com o controle, ** p=0.0043 controle OGD x 5 d-Pro OGD, *** p=0.001 comparado com grupo OGD (n= 6-19)

Liberação de glutamato

Após a análise da curva, gerando uma concentração protetora de 1nM e a escolha do antagonista, o passo seguinte foi avaliar a via de sinalização de glutamato. A interpretação do gráfico mostrado na figura 12 deve seguir os mesmos parâmetros dos anteriores com exceção do eixo y, em que é colocada a liberação de glutamato em mg/ml.

Analisando esta liberação no meio pelas células, foi primeiramente verificada a condição do protocolo isquêmico, podendo ser observado que no grupo OGD houve estatisticamente uma maior liberação de glutamato no meio quando comparado com o grupo nOGD ($F [5, 77] = 7.526; p < 0.0001$).

Analisando a condição do tratamento, comparando os grupos nOGD, nenhuma concentração foi alterou a liberação de glutamato. Comparando os grupos OGD, houve efeito do tratamento nas concentrações de 1nM e 10nM visto que a liberação é estatisticamente diferente do grupo OGD ($F [1, 77] = 224.8; p < 0.0001$).

Quando analisada a condição isquêmica entre os grupos tratados com 1nM e 10nM é possível encontrar diferença entre os grupos nOGD e OGD, mostrando que a alandina interfere no processo isquêmico (OGD 1nM x nOGD 1nM $p = 0.0002$; OGD 10nM x nOGD 10nM $p = 0.0300$).

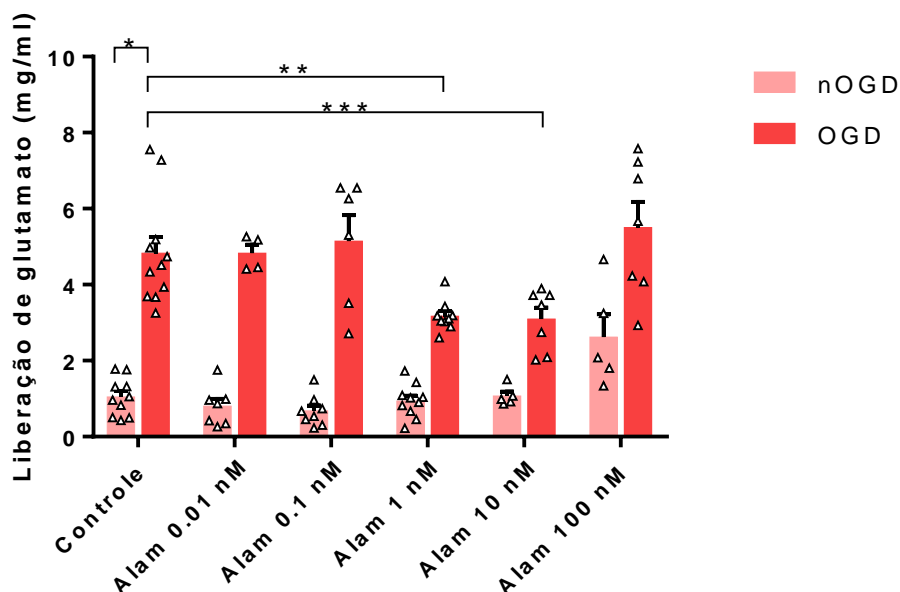


Figura 12: Liberação de glutamato em fatias hipocâmpais submetidas a privação de oxigênio e glicose

O gráfico mostra a liberação de glutamato em mg/ml. Os dados são expressos como média \pm SEM. Two-way ANOVA, post-hoc Tukey. * $p < 0.0001$ comparando com o controle, ** $p = 0.0143$ 1nM OGD x grupo OGD, *** $p = 0.0195$ (n= 4-11)

5.2. PERÍODO DA REPERFUSÃO

A curva concentração x resposta também foi gerada no período da reperfusão. As mesmas concentrações de alamandina e os parâmetros para criação do gráfico do período da isquemia foram utilizadas. Como pode ser visto no gráfico da figura 13, não se observou o padrão de curva em U como no primeiro gráfico.

Quando analisada a primeira dupla de barras (sem tratamento) pode ser visto que o grupo OGD apresentou uma quantidade de LDH liberado significativamente maior que o grupo nOGD, mostrando um efeito do protocolo isquêmico ($F(5, 149) = 5.599$; $p < 0.0001$). Quando avaliados os grupos que receberam tratamento, nenhum grupo apresentou diferença estatística de liberação de LDH quando avaliada a condição de protocolo isquêmico.

Analisando a condição do tratamento nos grupos nOGD, foi possível observar que nenhum grupo tratado com alamandina mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo controle nOGD.

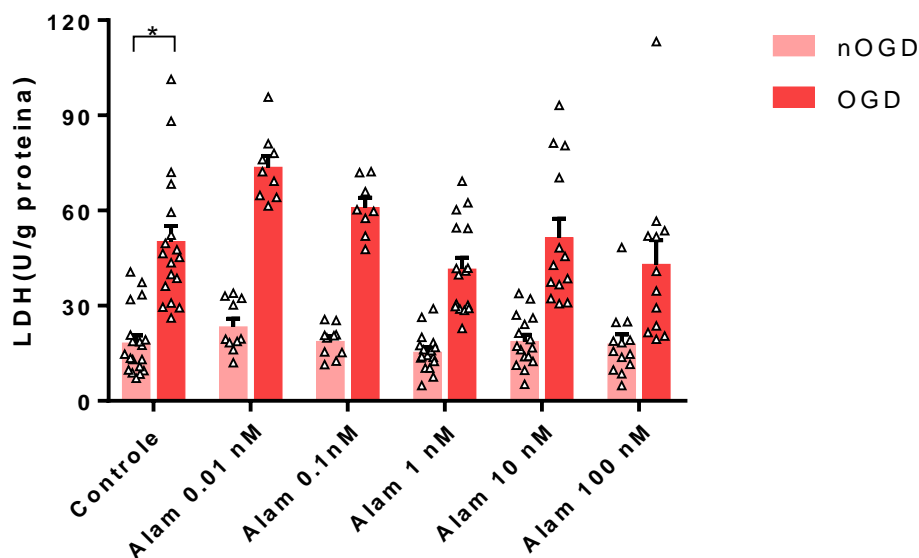


Figura 13: Curva dose resposta da alamandina durante o período de reperfusão em fatias hipocâmpicas de camundongos submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.

O gráfico mostra a liberação de lactato desidrogenase (LDH), que mostra o dano celular em U/g de proteína, durante a reperfusão em um modelo de OGD. Foram usadas as concentrações de alamandina (Alam) a 0,01nM, 0,1nM, 1nM, 10nM e 100nM. Os dados são mostrados com média \pm SEM. Two-way ANOVA, post-hoc tukey. * $p < 0.0001$ comparado com o controle. (n= 10-19).

Viabilidade celular

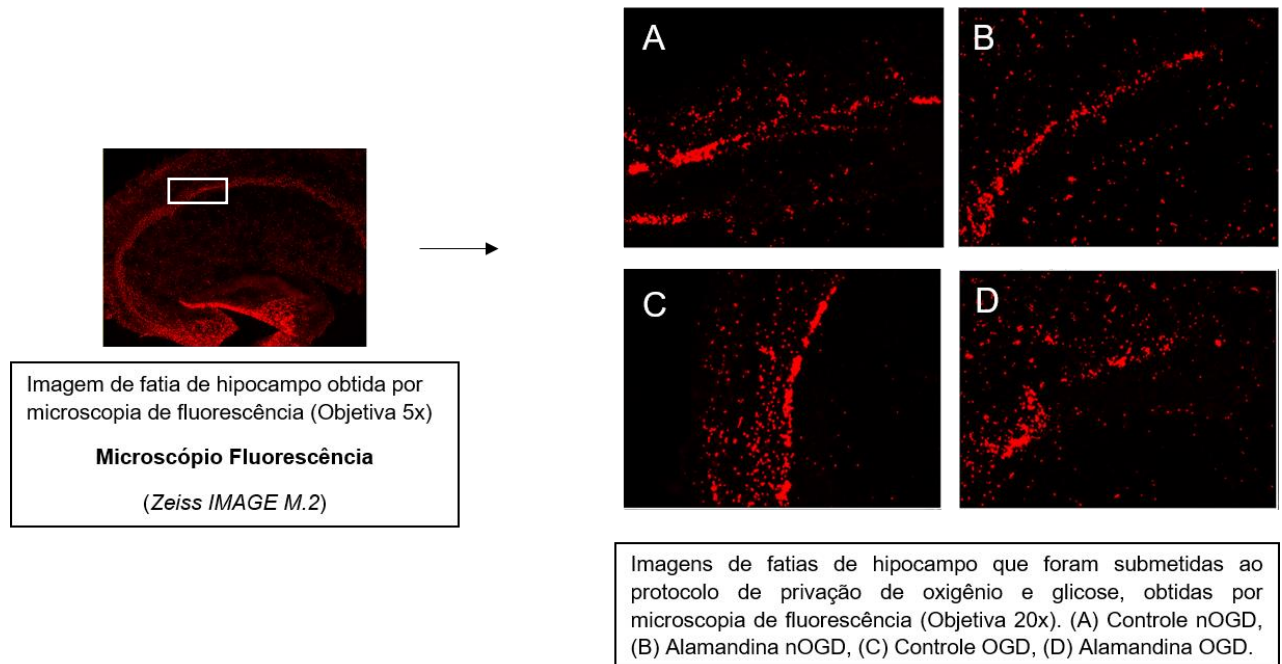
O último passo foi analisar a viabilidade celular a partir da marcação com etídio das células mortas pelo protocolo isquêmico. Fotos por microscopia fluorescente foram geradas e a quantificação da morte foi realizada pelo programa Image J. Na figura 14, o gráfico está representado no eixo x pelos grupos que passaram pelas condições escolhidas (sem / com isquemia; sem / tratamento com alamandina) e no eixo y pela quantidade de pixels marcados.

Observou-se que o grupo que passou pelo protocolo isquêmico, representado pela barra vermelha, apresentou quantidade significativamente

maior de pixels marcados quando comparado com o grupo que não passou pelo protocolo [F (1, 54) = 43.19; P<0.0001].

Em relação ao tratamento, o grupo OGD que recebeu a concentração de 1nM da alamandina não apresentou uma diferença de pixels marcadas significativa quando comparado com o grupo OGD controle (p=0.4997). Quando comparados os grupos tratados nOGD e OGD verificou-se que os grupos não são diferentes entre si.

É possível verificar também que o grupo nOGD que recebeu a concentração de 1nM da alamandina não obteve diferença em relação ao grupo nOGD controle (p=0.9536).



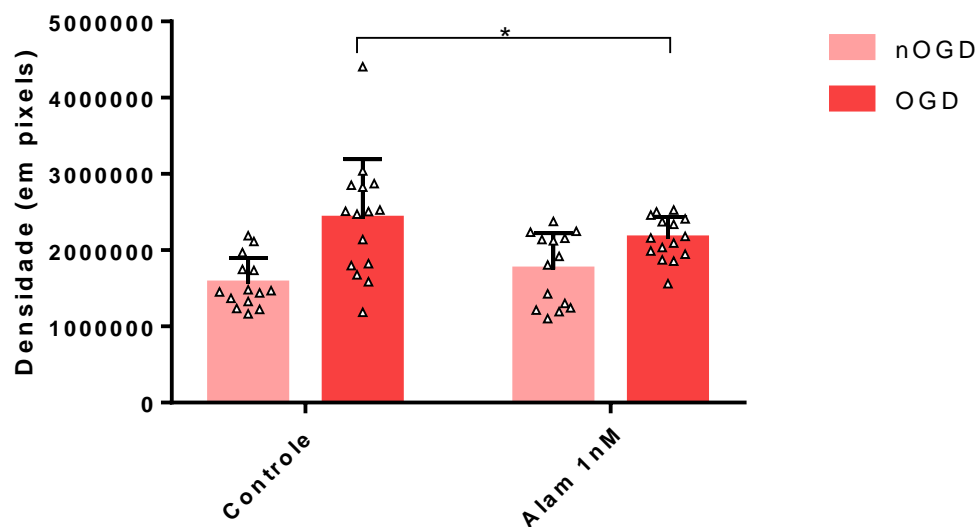


Figura 14: Viabilidade celular da região de CA1 de fatias hipocâmpais de camundongos submetidas ao modelo de privação de oxigênio e glicose.

O gráfico mostra a quantificação de células mortas na região escolhida. A concentração de alamandina utilizada foi de 1nM. Os dados são mostrados com média ± SEM. Two-way ANOVA, post-hoc tukey. * $p < 0.0001$ controle OGD x controle nOGD. (n= 14-17).

“ Acredite no poder da verdade... Não permita que sua mente seja aprisionada pelo pensamento da maioria. ”

Patricia Bath

6 DISCUSSÃO

A partir de um trabalho que mostrou ação neuroprotetora da Angiotensina-(1-7), precursora da alamandina, em um modelo in vivo, diminuindo o volume de infarto do hipocampo de camundongos submetidos à isquemia (MECCA et al., 2011), o sistema renina angiotensina mostrou-se um interessante foco de estudos de isquemia. Com as poucas, porém protetoras ações no sistema cardiovascular descobertas até então, e quase nenhum estudo cerebral, o estudo das ações da alamandina durante o AVE gerou grande interesse.

Desde sua descoberta, a alamandina já mostrou ter efeitos muito benéficos em diversos sistemas fisiológicos, como o cardiovascular, o renal e o endócrino. No sistema nervoso, ela começou a ser estudada há poucos anos e diversas

ações puderam ser observadas. Assim como é capaz de aumentar a pressão e a atividade simpática no núcleo paraventricular do hipotálamo de ratos espontaneamente hipertensos, é também capaz de gerar efeito hipotensor quando injetada no bulbo ventrolateral caudal (SHEN et al., 2018; SOARES et al., 2017). Ainda não foi realizado um estudo deste peptídeo em um protocolo de AVE e não são sabidas suas ações perante os processos isquêmicos.

A escolha pela alamandina neste trabalho também foi baseada em dados ainda não publicados e gerados pelo nosso grupo de laboratório em que a angiotensina-(1-7), apresentou ação neuroprotetora no mesmo modelo aqui apresentado, em que a liberação de LDH pelo grupo OGD tratado foi menor que o grupo OGD controle.

Neste trabalho, portanto, foi utilizado o mesmo modelo in vitro que mimetiza um AVE isquêmico em fatias hipocâmpais de camundongos. A utilização de modelos animais é de extrema importância para tentar mimetizar as ações fisiológicas do corpo humano e diminuir os interferentes da fisiologia animal, seu dinamismo e tirar sua complexidade, criando um ambiente controlado e isolado.

Primeiramente é importante entender os dois momentos deste trabalho: a isquemia e a reperfusão. Quando colocada uma substância no período da isquemia, objetiva-se determinar seu mecanismo de possível proteção prematura; já quando colocada na reperfusão, dá-se uma análise mais clínica, mimetizando uma situação real em que um paciente já acometido pelo AVE, chega ao hospital e antes do processo de reperfusão ser iniciado, recebe a substância, que age em alguns ou todos os processos isquêmicos deste período. Neste trabalho, as duas

janelas foram escolhidas, uma vez que nada se sabe da ação da alamandina durante um AVE.

Do mesmo modo como ocorre em seres humanos, quando há a parada do sangue, há influxo de íons Ca^{2+} e excitotoxicidade glutamatérgica, as primeiras vias de sinalização de dano e futura morte celular; esse período é chamado de isquemia (DESSI et al., 1993; PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1992). Quando há volta do sangue nos vasos o processo de reperfusão começa, que como descrito anteriormente, gera estresse oxidativo, inflamação, lipoperoxidação, disfunção da barreira hematoencefálica, e por fim, a morte celular ou apoptose (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Então, quando uma substância consegue diminuir a concentração de glutamato nas fendas, ou seja, interferir em alguma destes processos pode-se dizer que ela protegeu o tecido e tem potencial de reversão de danos ou até mesmo a apoptose.

Portanto, separaremos em dois momentos o trabalho apresentado. Primeiramente, falaremos das ações da alamandina no período de isquemia e discutiremos todos os processos analisados. Posteriormente, o foco será na reperfusão.

Antes de discutirmos as ações da alamandina é importante ressaltar que não há estudos de suas ações durante um processo isquêmico, portanto primeiramente foi necessário criar uma curva de concentração x resposta do peptídeo. Baseado no trabalho de (UCHIYAMA et al., 2017), em que houve supressão da expressão e secreção de leptina pelo tecido adiposo e adipócitos

isolados de ratos, a uma concentração de 10nM, as concentrações de 0.01nM a 100nM foram escolhidas.

Além disso, foram avaliados vários estudos em modelos de cultura celular ou fatias cerebrais para determinação do tempo para manter o tempo de isquemia. Os tempos variavam entre 30 min a 240 min (DING et al., 2019; HERNÁNDEZ-GUILLAMON et al., 2014; OU-YANG et al., 2018; WEN et al., 2018; ZHANG et al., 2017b). A escolha de foi baseada principalmente no trabalho de Mourão *et al.* em que fatias hipocampais de animais sedentários e treinados foram submetidas ao processo isquêmico por 60 min (LEITE et al., 2012; MOURÃO et al., 2014).

A mesma busca foi realidade em relação ao tempo escolhido da reperfusão. E neste caso, foi considerado a cronologia dos processos isquêmicos. Como o objetivo foi analisar somente o dano celular foi escolhido o tempo de 60 min também.

6.1. ISQUEMIA

Curva concentração x reposta

Durante a isquemia há liberação de LDH pelas células que sofreram danos e sua quantificação pode ser analisada nos meios. Através da análise do LDH é possível avaliar o dano causado pelo protocolo, uma vez que sua liberação ocorre quando a membrana celular é danificada e essa enzima é eliminada no meio (BUNDGAARD et al., 2019; MARKERT, 1984). Esta análise é um teste indireto, uma vez que a função do LDH na reação enzimática realizada é de catalizador.

Primeiramente, quando analisado o grupo que passou pela privação de oxigênio e glicose (OGD controle) comparando com o grupo nOGD controle, pode

ser observada maior concentração de LDH. Isso nos mostra que nosso modelo gera os danos isquêmicos esperados (BUNDGAARD et al., 2019).

Na determinação da concentração neuroprotetora das fatias hipocampais, foi decidido gerar uma curva concentração x resposta que tem como objetivo representar graficamente a relação entre a concentração da substância e seu efeito. Quando o tratamento foi adicionado, observou-se um padrão de curva em U no gráfico 1. Este padrão de curva nos mostrou uma concentração protetora no centro e perda desta ação protetora nas extremidades da curva.

Quando analisada a figura 10, é possível observar que nenhuma concentração escolhida de alamandina altera a liberação de LDH em uma condição não isquêmica quando comparada com o grupo nOGD controle. Quando analisadas as concentrações de alamandina escolhidas, foi possível observar que no grupo submetido pelo processo isquêmico e que recebeu o tratamento com a concentração de 1nM há menor quantidade de LDH que o grupo OGD controle.

Portanto, a alamandina foi capaz de proteger os tecidos hipocampais dos danos celulares, favorecendo a homeostasia do ambiente. Essa diminuição da liberação de LDH em modelo de dano tecidual também pode ser observada em estudos em modelos de isquemia / reperfusão em diversos sistemas. Em um modelo de isquemia / reperfusão cerebral em cachorros tratados com acetol-L-carnitina, os níveis de LDH mensurados assemelharam-se ao dos cachorros controle e foram significativamente menores que dos cachorros submetidos ao protocolo e que não foram tratados (BOGAERT; ROSENTHAL; FISKUM, 1994; PARK et al., 2018; ROSENTHAL et al., 1992). Também no sistema nervoso

central, observou-se neuroproteção por etanol e Modafinil em ratos submetidos a isquemia focal (ABBASI et al., 2019).

Bi et al (2019) observaram uma redução dos níveis de LDH sérico em camundongos que sofreram o protocolo de isquemia / reperfusão renal e foram tratados com irisina quando comparados com o grupo veículo (BI et al., 2019). Os níveis de LDH também diminuíram em modelo hepático quando em contato com células tronco derivadas de adipócitos (GE et al., 2018). Estudos deste modelo no tecido cardíaco também apontam melhora da função cardíaca e da área de infarto e concomitante diminuição da atividade do LDH (HU et al., 2018; QIU et al., 2018; XIAO et al., 2018).

Visto que a redução da lactato desidrogenase relaciona-se com a proteção do dano isquêmico, o próximo passo foi analisar esta ação da alamandina pelo seu receptor considerado específico, MrgD e verificar se a neuroproteção é conservada.

Alamandina e seu receptor específico MrgD

Em 2013, junto com a descoberta da alamandina, Lautner et al descobriram que o vasorelaxamento em anéis de aorta, uma das ações da alamandina no tecido cardíaco, de camundongos era totalmente antagonizado quando utilizado o antagonista da ação da angiotensina-(1-7), o d-Pro. Analisando um receptor fraco da angiotensina-(1-7), o MrgD, foi realizado um binding e estudos funcionais em células transfectadas com o receptor MrgD e por imagem de microscopia pode ser visto que a alamandina liga-se especificamente a este receptor (ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014; LAUTNER et al., 2013).

A partir deste estudo, o próximo passo foi analisar se no SNC esta dinâmica estaria conservada. Foi utilizada a concentração de 1nM que se mostrou neuroprotetora no tópico anterior. Como pode ser visto no gráfico 3, na presença de alamandina e antagonizando o receptor MrgD, sua ação neuroprotetora é perdida, quando analisada a liberação de LDH comparando com o grupo controle OGD.

Este dado corrobora com estudos que também avaliaram a relação alamandina / MrgD, em que houve perda da ação do peptídeo. Park et al (2018) observou que o antagonismo do receptor MrgD em ratos Sprague-Dawley submetidos a isquemia atenuou os efeitos cardioprotetores da alamandina (PARK et al., 2018). Em um estudo com coelhos com hiperhomocisteinemia, o antagonismo impediu a alamandina de reverter a disfunção vascular induzida pela doença (QARADAKHI et al., 2017). Porém, nem sempre este antagonismo representa uma minimização ou cessação de um efeito benéfico.

Um estudo realizado em ratos espontaneamente hipertensos e Wistar-Kyoto, o antagonismo reverteu a ação hipertensiva e a ativação simpática da alamandina no núcleo paraventricular do hipotálamo (SHEN et al., 2018).

Os estudos aqui apresentados ressaltam a relação alamandina / MrgD, em que seu antagonismo gera cessação de suas ações. O interessante é avaliar como este antagonismo interfere nas ações do peptídeo, uma vez que no SNC pode ser visto que não somente há cessação de efeitos cardioprotetores, mas também de sua ação hipertensiva.

Uma análise importante de destacar é que além da perda da ação neuroprotetora, a liberação de LDH do grupo tratado com alamandina + d-Po foi estatisticamente diferente e maior que o grupo OGD controle. Uma explicação deste aumento de LDH seria a especificidade da ligação entre alamandina / receptor MrgD. Quando este é antagonizado, suprime tanto a ação do peptídeo, tanto endógeno como exógeno, que a ação neuroprotetora é perdida e deixa mais susceptível a isquemia, até aumentando seus danos.

Glutamato

Após mostrarmos que a alamandina na concentração de 1nM é protetora de dano celular isquêmico e que sua neuroproteção pode ser perdida quando antagonizado seu receptor MrgD, quisemos analisar a primeira via de sinalização da morte celular, a excitotoxicidade glutamatérgica. Como citado já anteriormente, a liberação em grande quantidade de glutamato na fenda sináptica e sua não recaptção, é um dos primeiros processos de dano isquêmico sendo o sinalizador dos processos futuros (DÁVALOS et al., 1997; DEB; SHARMA; HASSAN, 2010; DESSI et al., 1993; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Como pode ser observado na figura 13, o protocolo de isquemia ocasionou uma maior concentração de glutamato no meio quando comparado com o grupo que não sofreu a privação. Este dado sustenta a relação do neurotransmissor com o processo isquêmico (BENVENISTE et al., 1984; FERRIGNO et al., 2018; LI et al., 2018; ROTHMAN; OLNEY, 1995; XU et al., 2017).

Analisando a concentração de glutamato nos meios, as concentrações de 1nM e 10nM da alamandina no grupo controle OGD foram capazes de gerar

menor liberação de glutamato quando comparado com o grupo OGD controle. Porém, pode ser observada que esta diminuição não chegou a níveis basais, quando comparado com o grupo nOGD controle.

Esses dados apontam uma importante discussão em relação à importância das primeiras vias de sinalização da isquemia e de que como é significativa a concentração deste neurotransmissor presente no meio, que conseqüentemente, não foi receptado da fenda sináptica pelos astrócitos. Este glutamato remanescente pode ser capaz de continuar a sinalização de Ca^{2+} que, por conseguinte, ativa a cascata de apoptose celular (ALI et al., 2019). Portanto, não pode ser considerada uma proteção completa nesta via. Este resultado certamente influencia a proteção das fatias hipocâmpais no próximo período, o da reperfusão.

Até aqui o foco da discussão foi do primeiro período do AVE isquêmico: a isquemia. Nele pode ser observado que a substância em foco é capaz de proteção de dano celular na concentração de 1nM, que sua ação pode ser realizada pelo receptor MrgD e que há menor liberação de glutamato no meio nas concentrações de 1nM e 10nM, mas não suficiente para níveis basais.

O próximo passo, portanto, foi avaliar a ação da alamandina no período da reperfusão e as conseqüências da falta de proteção glutamatérgica.

6.2. REPERFUSÃO

Visto que a alamandina, a uma concentração de 1nM, foi capaz de proteger o tecido hipocâmpal durante o período da isquemia, decidimos analisar sua ação também no período da reperfusão. Porém, como pode ser visto no gráfico 4 o tratamento com alamandina não foi eficaz, uma vez que nenhuma das

concentrações, mesmo a de 1nM foi capaz de gerar proteção durante um processo isquêmico. Os níveis de LDH não chegaram a níveis basais, e não foi observada diferença quando comparados com o grupo controle OGD.

Uma explicação para este acontecido pode ser na via glutamatérgica como discutido anteriormente. O dano celular subsequente ao inicial não pode ser revertido pela contínua sinalização celular glutamatérgica que ativa as cascatas posteriores de dano e conseqüentemente a morte celular.

É importante destacar a influência do estudo das vias do estresse oxidativo geradas pelo dano mitocondrial a partir da ação dos radicais livres, uma vez que ativadas pelas primeiras sinalizações, causam sérios danos à membrana celular e nuclear (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; KAVIARASI et al., 2019). E alguns mostram que há substâncias capazes de reduzir ou eliminar o estresse oxidativo, protegendo as células do dano isquêmico (WEN et al., 2018; ZHANG et al., 2017b).

Não só essa via, mas todas as envolvidas, em conjunto, têm um papel fundamental no perfil isquêmico. Porém, como são necessários mais estudos para avaliação destas vias isquêmicas, o próximo passo, neste trabalho, foi analisar as fatias de um modo mais direto, avaliando a morte celular por microscopia, o que geraria uma análise melhor da ação final da alamandina no modelo isquêmico.

Viabilidade celular

Assim, a ação da alamandina seria considerada somente isquêmica, no primeiro período do AVE. Mas se mostrava necessário mais um passo: comprovar

esta seletividade temporal através de uma técnica microscópica de marcação de morte celular.

No mesmo trabalho do nosso grupo já citado aqui anteriormente, as fatias hipocâmpais foram submetidas a um protocolo de marcação de morte celular, em que a ação neuroprotetora da angiotensina-(1-7) foi avaliada e resultou em proteção de morte celular. Por isso, o próximo e último passo foi analisar a ação protetora da alamandina no tecido hipocâmpal, e não no meio, nos mesmos parâmetros anteriormente testados.

Depois de coradas, as fatias foram levadas ao microscópio, a marcação da morte escolhida em tom vermelho e a quantificação da morte celular realizada.

Como pode ser visto no gráfico 5 e nas imagens de microscopia, o grupo OGD tratado não mostrou uma diferença significativa quando comparado com o grupo OGD controle. Porém, quando comparado com o grupo nOGD tratado não houve diferença na morte celular sendo possível observar que em presença de alamandina o evento isquêmico não teve ação, não gerando a morte que o grupo OGD controle causa. Através das imagens e do gráfico foi possível verificar a redução da densidade de morte deste grupo. Com estes dados, foi possível determinar que a alamandina é capaz de proteger as fatias hipocâmpais da morte durante um evento isquêmico.

A partir de todos estes dados, pode-se perceber que os mecanismos ao longo do processo isquêmico são específicos e respeitam uma temporalidade; e que os processos podem ser influenciados quando em contato com substâncias. No caso deste, houve redução do dano no período da isquemia, mas que não foi

observado durante a reperfusão. Porém, quando analisada a morte celular, que é o fim dos processos, houve uma proteção por parte da alamandina.

Mesmo a alamandina não tendo protegido as fatias do dano isquêmico na reperfusão pela análise de LDH, seria muito importante, analisar suas ações nos outros processos da reperfusão, como estresse oxidativo, inflamação, lipoperoxidação, uma vez que houve proteção de morte, para determinação da via de proteção que gerou a menor densidade de morte na análise de live / dead, e além disso, testá-la em um modelo in vivo, em que é deixado o ambiente controlado e isolado, e a fisiologia animal é considerada.

“A arte e a natureza estarão sempre em luta até que, finalmente, uma conquiste a outra de modo que a vitória seja o traço e a linha.”

Maria Sibylla Merian

7 Considerações finais

Os estudos com a alamandina têm mostrado resultados promissores em diversos sistemas, podendo ser vistas suas ações protetoras em diversos modelos. No sistema nervoso, porém, os estudos ainda são um pouco divergentes.

Neste modelo de isquemia, a alamandina mostrou proteção no dano celular e diminuição de excitotoxicidade quando analisada a liberação de glutamato. A partir da análise de LDH, não pode ser vista proteção no período da reperfusão, porém foi observada proteção na análise da morte celular. Portanto, para que seja considerada uma substância promissora no SNC mais estudos necessitam ser realizados, principalmente durante o período de reperfusão, a fim de entender melhor a dinâmica do peptídeo.

Um passo importante seria a análise de sua ação nas cascatas de dano durante a reperfusão, como a inflamação, o estresse oxidativo, a lipoperoxidação, o dano mitocondrial, nuclear e a apoptose, a partir da análise das caspases. Para uma análise mais dinâmica e complexa, outro modelo de isquemia interessante seria o in vivo, MCAo (oclusão da artéria cerebral média), que teria como objetivo estudar a interação da alamandina com o sistema como um todo.

Considerando a relação alamandina/receptores, a utilização de animais knockouts, com a deleção de receptores importantes do sistema SRA, como o MrgD e o AT1, seria mais um modo de entender suas influências na dinâmica do sistema.

É importante salientar que precisam ser realizados muitos estudos para que a alamandina seja considerada uma possível candidata a tratamento de pacientes acometidos pelo AVE.

“ Acima de tudo, não tema os momentos difíceis. O melhor vem deles. ”

Rita Levi-Montalcini

8 CONCLUSÃO

Durante o período da isquemia, a alamandina foi capaz de neuroproteger do dano celular as fatias hipocampais submetidas à privação de oxigênio e glicose e sua ação pode ser vista através do seu receptor específico MrgD. A alamandina foi capaz de proteger as células hipocampais da morte

“A vida não precisa ser fácil, desde que não tenha sido vazia”

Lise Meitner

9 REFERÊNCIAS

ABBASI, Y. et al. Neuroprotective effect of ethanol and Modafinil on focal cerebral ischemia in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 3, p. 805–819, 15 jun. 2019.

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 41–53, jan. 2006.

ALI, S. A. et al. Pregabalin affords retinal neuroprotection in diabetic rats: Suppression of retinal glutamate, microglia cell expression and apoptotic cell death. **Experimental Eye Research**, v. 184, p. 78–90, 1 jul. 2019.

- AZAD, T. D. et al. Therapeutic strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier. **Neurosurgical Focus**, v. 38, n. 3, p. E9, mar. 2015.
- BANKS, W. A. From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 275–292, abr. 2016.
- BARRES, B. A. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430–440, 6 nov. 2008.
- BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. e67–e492, 20 mar. 2018.
- BENNION, D. M. et al. Neuroprotective Mechanisms of the ACE2–Angiotensin-(1-7)–Mas Axis in Stroke. **Current Hypertension Reports**, v. 17, n. 2, p. 3, 27 jan. 2015.
- BENVENISTE, H. et al. Elevation of the Extracellular Concentrations of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus During Transient Cerebral Ischemia Monitored by Intracerebral Microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1369–1374, 1984.
- BERRIDGE, M. V.; SCHNEIDER, R. T.; MCCONNELL, M. J. Mitochondrial Transfer from Astrocytes to Neurons following Ischemic Insult: Guilt by Association? **Cell Metabolism**, v. 24, n. 3, p. 376–378, 13 2016.
- BI, J. et al. Irisin alleviates liver ischemia-reperfusion injury by inhibiting excessive mitochondrial fission, promoting mitochondrial biogenesis and decreasing oxidative stress. **Redox Biology**, v. 20, p. 296–306, 1 jan. 2019.
- BOGAERT, Y. E.; ROSENTHAL, R. E.; FISKUM, G. Postischemic inhibition of cerebral cortex pyruvate dehydrogenase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, n. 6, p. 811–820, jun. 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BUNDGAARD, A. et al. Metabolic adaptations during extreme anoxia in the turtle heart and their implications for ischemia-reperfusion injury. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2850, 26 fev. 2019.
- CASALS, J. B. et al. The use of animal models for stroke research: a review. **Comparative Medicine**, v. 61, n. 4, p. 305–313, ago. 2011.
- CASTILLO, J. et al. A novel mechanism of neuroprotection: Blood glutamate grabber. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 36, n. 2, p. 292–301, fev. 2016.
- CASTILLO, J.; DÁVALOS, A.; NOYA, M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. **Lancet (London, England)**, v. 349, n. 9045, p. 79–83, 11 jan. 1997.
- CESÁRIO, C. M. M.; PENASSO, P. Impacto da disfunção motora na qualidade de vida em pacientes com Acidente Vascular Encefálico. p. 4, 2006.

- CHAMORRO, Á. et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. **The Lancet. Neurology**, v. 15, n. 8, p. 869–881, 2016.
- CHEN, L.; GAO, X. The application of nanoparticles for neuroprotection in acute ischemic stroke. **Therapeutic Delivery**, v. 8, n. 10, p. 915–928, 2017.
- DA SILVA, A. R. et al. Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 2, p. 117–128, fev. 2017.
- DÁVALOS, A. et al. Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 28, n. 4, p. 708–710, abr. 1997.
- DE MORAES, P. L. et al. **Vasodilator Effect of Angiotensin-(1-7) on Vascular Coronary Bed of Rats: Role of Mas, ACE and ACE2**. Text. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/ppl/2017/00000024/00000009/art00014>>. Acesso em: 8 jan. 2019.
- DEB, P.; SHARMA, S.; HASSAN, K. M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. **Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology**, v. 17, n. 3, p. 197–218, jun. 2010.
- DESSI, F. et al. Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 5, p. 1953–1955, maio 1993.
- DING, Y. et al. Effects of SC99 on cerebral ischemia-perfusion injury in rats: Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype via inhibiting JAK2-STAT3 pathway. **Neuroscience Research**, 12 maio 2018.
- DING, Y. et al. Effects of SC99 on cerebral ischemia-perfusion injury in rats: Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype via inhibiting JAK2-STAT3 pathway. **Neuroscience Research**, v. 142, p. 58–68, maio 2019.
- DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–397, set. 1999.
- DUAN, Y. et al. Loss of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Exacerbates Diabetic Retinopathy by Promoting Bone Marrow Dysfunction. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, 15 maio 2018.
- DZIEDZIC, T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 15, n. 5, p. 523–531, 4 maio 2015.
- EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 380–401, dez. 2013.
- ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, 7 nov. 2011.

- EDELVINO, G. M.; PELUSO, A. A. B.; SANTOS, R. A. S. New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. **Current Hypertension Reports**, v. 16, n. 6, p. 433, jun. 2014.
- FERRIGNO, A. et al. Selective Blockade of the Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5 Protects Mouse Livers in In Vitro and Ex Vivo Models of Ischemia Reperfusion Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 314, fev. 2018.
- FURUKAWA, K. et al. The Actin-Severing Protein Gelsolin Modulates Calcium Channel and NMDA Receptor Activities and Vulnerability to Excitotoxicity in Hippocampal Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8178–8186, 1 nov. 1997.
- GE, Y. et al. Adipose-derived stem cells reduce liver oxidative stress and autophagy induced by ischemia-reperfusion and hepatectomy injury in swine. **Life Sciences**, v. 214, p. 62–69, 1 dez. 2018.
- GEMBARDT, F. et al. Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 319, n. 1–2, p. 115–123, dez. 2008.
- GODINO, M. DEL C. et al. Amelioration of ischemic brain damage by peritoneal dialysis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 4359–4363, 1 out. 2013.
- GROTTA, J. C.; HELGASON, C. Ischemic stroke pathophysiology. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association**, v. 8, n. 3, p. 114–116, jun. 1999.
- HABIYAKARE, B. et al. Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 4, p. 290–295, 2014.
- HANKEY, G. J. Stroke. **The Lancet**, v. 389, n. 10069, p. 641–654, 11 fev. 2017.
- HAYAKAWA, K. et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. **Nature**, v. 535, n. 7613, p. 551–555, jul. 2016.
- HEKMAT, A. S. et al. Differences in cardiovascular responses to alamandine in two-kidney, one clip hypertensive and normotensive rats. **Circulation Journal**, v. 81, n. 3, p. 405–412, 2017.
- HERNÁNDEZ-GUILLAMON, M. et al. Mild hypothermia protects against oxygen glucose deprivation (OGD)-induced cell death in brain slices from adult mice. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 121, n. 2, p. 113–117, fev. 2014.
- HOSSMANN, K. A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. **Annals of Neurology**, v. 36, n. 4, p. 557–565, out. 1994.
- HU, S. et al. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 11, p. 3677–3688, 15 nov. 2018.

JESUS, I. C. G. DE et al. Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against Ang II hypertrophy in cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 314, n. 6, p. C702–C711, 2018.

JIANG, T. et al. Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 7, p. 1520–1532, 2012.

JIANG, T.; GAO, L.; ZHANG, J. L. AND Y.-D. **ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke**. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/107887/article>>. Acesso em: 22 dez. 2018.

JIANG, X. et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. **Progress in Neurobiology**, v. 163–164, p. 144–171, maio 2018.

KATSURA, K.; KRISTIÁN, T.; SIESJÖ, B. K. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 4, p. 991–996, nov. 1994.

KAVIARASI, S. et al. Emerging paradigms in nanotechnology for imaging and treatment of cerebral ischemia. **Journal of Controlled Release**, v. 300, p. 22–45, 28 abr. 2019.

KOSTANDY, B. B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. **Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 33, n. 2, p. 223–237, abr. 2012.

KYLE, S.; SAHA, S. Nanotechnology for the detection and therapy of stroke. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 11, p. 1703–1720, nov. 2014.

LAUTNER, R. Q. et al. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. **Circulation Research**, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 12 abr. 2013.

LEITE, H. R. et al. Swim training attenuates oxidative damage and promotes neuroprotection in cerebral cortical slices submitted to oxygen glucose deprivation. **Journal of Neurochemistry**, v. 123, n. 2, p. 317–324, out. 2012.

LI, P. et al. Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways. **Life Sciences**, 18 abr. 2018.

LIU, C. et al. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. **Amino Acids**, 12 maio 2018.

LIU, H. et al. Fullerol antagonizes dexamethasone-induced oxidative stress and adipogenesis while enhancing osteogenesis in a cloned bone marrow mesenchymal stem cell. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 30, n. 7, p. 1051–1057, jul. 2012.

LIU, M.; SHI, P.; SUMNERS, C. Direct anti-inflammatory effects of angiotensin-(1–7) on microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 1, p. 163–171, 2016.

- MAJDI, A. et al. The interplay of microRNAs and post-ischemic glutamate excitotoxicity: an emergent research field in stroke medicine. **Neurological Sciences**, v. 37, n. 11, p. 1765–1771, 1 nov. 2016.
- MALMBERG, A. B. et al. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5336, p. 279–283, 10 out. 1997.
- MANZANERO, S.; SANTRO, T.; ARUMUGAM, T. V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. **Neurochemistry International**, Special Issue: Oxidative Stress and Neurodegeneration. v. 62, n. 5, p. 712–718, 1 abr. 2013.
- MARKERT, C. L. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase. **Cell biochemistry and function**, v. 2, n. 3, p. 131–134, 1984.
- MASSENSINI, A. R. et al. Alpha- and beta-scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 3, p. 289–297, 1998.
- MAYER, S. A.; RINCON, F. Treatment of intracerebral haemorrhage. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 10, p. 662–672, out. 2005.
- MECCA, A. P. et al. Cerebroprotection by angiotensin-(1–7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 10, p. 1084–1096, 2011.
- MENDOZA-TORRES, E. et al. ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 9, n. 4, p. 217–237, ago. 2015.
- MENDOZA-TORRES, E. et al. Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion injury by angiotensin-(1–9) through an AT2R and Akt-dependent mechanism. **Pharmacological Research**, v. 135, p. 112–121, 1 set. 2018.
- MENG, Y. et al. The Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin (1–7)/Mas Axis Protects Against Lung Fibroblast Migration and Lung Fibrosis by Inhibiting the NOX4-Derived ROS-Mediated RhoA/Rho Kinase Pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 3, p. 241–258, 4 ago. 2014.
- MIKHED, Y. et al. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15918–15953, 13 jul. 2015.
- MILANLIOGLU, A. et al. Serum antioxidant enzymes activities and oxidative stress levels in patients with acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 128, n. 5, p. 169–174, 1 mar. 2016.
- MONETTE, R. et al. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. **Brain Research. Brain Research Protocols**, v. 2, n. 2, p. 99–108, jan. 1998.
- MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181–198, 29 jul. 2010.

- MOURÃO, F. A. G. et al. Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to in vitro ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 1, p. 65–73, out. 2014.
- MÜNDEL, T. et al. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 8, p. 1551–1557, ago. 2005.
- NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-Dependent and-Independent Release of Glutamate from Synaptosomes Monitored by Continuous Fluorometry. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, n. 1, p. 50–57, 1 jul. 1987.
- OCARANZA, M. P. et al. Angiotensin-(1–9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 1054, maio 2010.
- OCARANZA, M. P. et al. Angiotensin-(1–9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. **Journal of Hypertension**, v. 32, n. 4, p. 771, abr. 2014.
- OU-YANG, L. et al. Carnosine suppresses oxygen-glucose deprivation/recovery-induced proliferation and migration of reactive astrocytes of rats in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 39, n. 1, p. 24–34, jan. 2018.
- PANULA, P. et al. Neuropeptide FF and modulation of pain. **Brain Research**, v. 848, n. 1–2, p. 191–196, 27 nov. 1999.
- PARK, B. M. et al. Alamandine Protects the Heart Against Reperfusion Injury via the MrgD Receptor. **Circulation Journal**, v. 82, n. 10, p. 2584–2593, 2018.
- PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 313–370, 1 abr. 1977.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. et al. Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 21, p. 10499–10503, 1 nov. 1992.
- POWERS, W. J. et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 49, n. 3, p. e46–e110, 2018.
- QARADAKHI, T. et al. Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 35, n. 6, dez. 2017.
- QARADAKHI, T.; APOSTOLOPOULOS, V.; ZULLI, A. Angiotensin (1-7) and Alamandine: Similarities and differences. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 820–826, 2016.
- QIU, Z. et al. Role of NLRP3 inflammasome in pyroptosis during myocardial ischemia-reperfusion in diabetic rats. **Chinese Journal of Anesthesiology**, v. 38, n. 6, p. 732–735, 1 jan. 2018.

RAFII, M. S.; HILLIS, A. E. Compendium of cerebrovascular diseases. **International Review of Psychiatry**, v. 18, n. 5, p. 395–407, jan. 2006.

ROSENTHAL, R. E. et al. Prevention of postischemic canine neurological injury through potentiation of brain energy metabolism by acetyl-L-carnitine. **Stroke**, v. 23, n. 9, p. 1312–1317; discussion 1317-1318, set. 1992.

ROTHMAN, S. M.; OLNEY, J. W. Excitotoxicity and the NMDA receptor - still lethal after eight years. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 2, p. 57–58, 1 fev. 1995.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 3, p. 130–136, mar. 1995.

SACCO, R. L. et al. Guidelines for Prevention of Stroke in Patients With Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke: Co-Sponsored by the Council on Cardiovascular Radiology and Intervention: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 577–617, fev. 2006.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 8 jul. 2003.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1–7) and Mas: new players of the renin–angiotensin system. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. R1–R17, 1 fev. 2013.

SHEN, Y.-H. et al. Alamandine injected into the paraventricular nucleus increases blood pressure and sympathetic activation in spontaneously hypertensive rats. **Peptides**, v. 103, p. 98–102, maio 2018.

SINISCALCHI, A. et al. Cerebral stroke injury: the role of cytokines and brain inflammation. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 131–137, 1 maio 2014.

SKIBA, D. S. et al. Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1–7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 22, p. 4055–4069, 2017.

SOARES, E. R. et al. Hypotensive effect induced by microinjection of Alamandine, a derivative of angiotensin-(1–7), into caudal ventrolateral medulla of 2K1C hypertensive rats. **Peptides**, v. 96, p. 67–75, 1 out. 2017.

SUN, M.-S. et al. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 31 jan. 2018.

TETZNER, A. et al. Decarboxylation of Ang-(1–7) to Ala1-Ang-(1–7) leads to significant changes in pharmacodynamics. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 116–123, 15 ago. 2018.

UCHIYAMA, T. et al. Alamandine reduces leptin expression through the c-Src/p38 MAP kinase pathway in adipose tissue. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0178769, 2017.

VERMEHREN, P. et al. Cooperation between NMDA-Type Glutamate and P2 Receptors for Neuroprotection during Stroke: Combining Astrocyte and Neuronal Protection. **Neuroglia**, v. 1, n. 1, p. 30–47, 14 mar. 2018.

VILLELA, D. C.; PASSOS-SILVA, D. G.; SANTOS, R. A. Alamandine: a new member of the angiotensin family. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 23, n. 2, p. 130–134, 2014.

WEN, Z. et al. 6'-O-Galloylpaeoniflorin Attenuates Cerebral Ischemia Reperfusion-Induced Neuroinflammation and Oxidative Stress via PI3K/Akt/Nrf2 Activation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 8678267, 2018.

XIAO, J. et al. The cardioprotective effect of thymoquinone on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart via regulation of apoptosis and autophagy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 9, p. 7212–7217, 1 set. 2018.

XU, L. et al. Neuroprotective effects of autophagy inhibition on hippocampal glutamate receptor subunits after hypoxia-ischemia-induced brain damage in newborn rats. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 3, p. 417–424, mar. 2017.

YANG, J.-L.; MUKDA, S.; CHEN, S.-D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke. **Redox Biology**, v. 16, p. 263–275, jun. 2018.

YOUNG, D. et al. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. **Cell**, v. 45, n. 5, p. 711–719, 6 jun. 1986.

YU, L. et al. Angiotensin-(1-5), an active mediator of renin-angiotensin system, stimulates ANP secretion via Mas receptor. **Peptides**, v. 86, p. 33–41, 1 dez. 2016.

ZHANG, H. et al. Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. **Nature**, v. 544, n. 7650, p. 327–332, abr. 2017a.

ZHANG, W. et al. Sirtuin 6 protects the brain from cerebral ischemia/reperfusion injury through NRF2 activation. **Neuroscience**, v. 366, p. 95–104, 16 dez. 2017b.