

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**Lorena Figueiredo Fernandes**

**USO DE LIPOSSOMAS COM ANGIOTENSINA-(1-7) PARA O TRATAMENTO DE  
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

Belo Horizonte  
2022

**Lorena Figueiredo Fernandes**

**USO DE LIPOSSOMAS COM ANGIOTENSINA-(1-7) PARA O TRATAMENTO  
DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

**Versão final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor

*Orientador:* Prof. André Ricardo Massensini

*Coorientador:* Prof. Frederic Jean G. Frezard

Belo Horizonte

2022

043

Fernandes, Lorena Figueiredo.

Uso de lipossomas com angiotensina-(1-7) para o tratamento de acidente vascular encefálico [manuscrito] / Lorena Figueiredo Fernandes. – 2022.

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

Orientador: Prof. André Ricardo Massensini. Coorientador: Prof. Frederic Jean G. Frezard.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Farmacologia. 3. Acidente Vascular Cerebral. 4. Lipossomos. 5. Angiotensinas. 6. Nanopartículas. 7. Isquemia. 8. Barreira Hematoencefálica. I. Massensini, André Ricardo. II. Frezard, Frederic Jean Georges. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências (NNC), no Nanolab do Departamento de Fisiologia e Biofísica, e no laboratório de Angiogênese do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), com o auxílio das seguintes agências de fomento:

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



UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE P6S-GRADUA AO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVA<;AO DA DEFESA DA TESE N° 356 DE LORENA FIGUEIREDO FERNANDES

"Uso de Lipossomas Com  
Angiotensina-(1-7) Para O  
Tratamento de Acidente  
Vascular Encefalico"

# LORENA FIGUEIREDO FERNANDES

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **24 de fevereiro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Pedro Pires Goulart Guimaraes**, ICB/ ICB/UFMG

**Prof. Dr. Lucas Miranda Kangussu**, ICB/UFMG

**Profa. Dra. Daniela Marti Barros**, ICB/FURG

**Profa. Dra. Neila Marcia Silva Barcellos**,

Escola de Farmacia/UFOP **Prof. Dr. Frederic**

**Jean Georges Frezard**, ICB/UFMG -

Coorientador **Prof. Dr. Andre Ricardo**

**Massensini**, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 24 de  
fevereiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora :



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira**, Professor do Magisterio Superior, em 25/02/2022, as 11 :42, conforme horario oficial de Brasilia , com fundamento no art . SQ do [Decreto nQ 10.543. de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Ricardo M assensini**, Professor do Magisterio Superior , em 25/ 02/ 2022, as 11 :56, conforme horario oficial de Brasilia , com fundamento no art. SQ do [Decreto nQ 10.543. de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Pires Goulart Guim ares**, Professor do Magisterio Superior , em 25/ 02/ 2022, as 15 :35, conforme horario oficial de Brasilia , com fundamento no art. SQ do [Decreto nQ 10. 543. de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederic Jean Georges Frezard**, **Professor do Magisterio Superior**, em 04/03/2022, às 03:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Neila Marcia Silva Barcellos**, **Usuario Externo**, em 04/03/2022, às 21:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Marti Barros**, **Usuario Externo**, em 23/03/2022, às 10:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_ace\\_sso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_ace_sso_externo=0), informando o código verificador **1249363** e o código CRC **F1208C7A**.

Referencia: Processo nº 23072.208331/2022-

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer ao prof. André que me aceitou como aluna desde a graduação e vem me orientando por todo esse tempo. E também ao prof. Frezard que aceitou ser meu coorientador desde a graduação e me ensinou toda a parte relacionada a nanotecnologia.

Gostaria de agradecer muito à toda a minha família, meus pais e meu irmão, que me apoiam e me acompanham em tudo que eu faço, me ajudando a superar desafios e me mostrando que sempre devo seguir os meus sonhos. E também a Anna Paula e ao Lucas que me acompanharam durante o doutorado e me deram sempre muito apoio.

A todos os alunos do prof. André do Núcleo de Neurociências que estiveram comigo nesses últimos 4 anos. À pós-doc Gisele que vêm contribuindo de forma muito significativa desde o meu mestrado nos experimentos e discussões dos resultados, além de também ter me ajudado muito na sugestão do sanduíche e que hoje se tornou meu próximo lugar de trabalho. Também ao pós-doc Leonardo que me ajudou muito com discussões e também com os experimentos de ressonância magnética e imunofluorescência e ao pós-doc Flávio que sempre foi muito disponível para tirar qualquer dúvida que eu tivesse. Aos alunos Beatriz, Aline, Eduardo e Marco Túllio, que me ajudaram com os experimentos ao longo de todo o mestrado e doutorado.

Também a todos os professores e alunos do NNC que me ajudaram com discussões, sugestões e ensinamentos durante todo o mestrado e doutorado, muito obrigada.

À prof. Lucíola do laboratório de Angiogênese que aceitaram contribuir com o projeto, e ao prof. Robson que colaborou com os experimentos com Ang-(1-7). Também ao aluno de pós-doc Wesley que me ajudou com os experimentos de estresse oxidativo.

E todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e possibilitaram que esse trabalho fosse realizado e finalizado da maneira como foi.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma das maiores causas de morte e incapacidade no mundo todo. Atualmente, os únicos tratamentos disponíveis para o AVE são a cirurgia de trombectomia e o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), contudo o número de pacientes elegíveis para seu uso é limitado, devido aos seus efeitos adversos e pequena janela terapêutica. A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um peptídeo endógeno do sistema renina-angiotensina, que tem demonstrado efeitos neuroprotetores em modelos de isquemia *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, a Ang-(1-7) é rapidamente metabolizada, e, por isso, a utilização de nanopartículas, como os lipossomas, é uma alternativa para prevenir essa rápida degradação e assim possibilitar que a Ang-(1-7) chegue ao seu alvo de ação e desempenhe suas funções. Lipossomas são vesículas biodegradáveis e biocompatíveis compostas por uma bicamada lipídica, com núcleo aquoso e com o potencial de aumentar a entrega e eficácia de fármacos utilizados no tratamento do AVE. Portanto, seu uso como carreadores de fármacos para o Sistema Nervoso Central (SNC) é uma ferramenta promissora para o tratamento do AVE. Nesse estudo, a Ang-(1-7) foi encapsulada em lipossomas para o tratamento do AVE. Camundongos CD1 foram submetidos à oclusão da artéria cerebral média (MCAO), e imediatamente após a reperusão ou 48 hs depois, receberam injeção intravenosa de lipossomas vazios ou com Ang-(1-7). Os camundongos ainda foram avaliados por escores neurológicos para análise funcional. Os grupos de animais tratados imediatamente após a cirurgia (agudo) foram sacrificados 24hs após a injeção, para coleta dos cérebros, análise do volume de infarto e imunofluorescência. Além desses grupos, também fizemos grupos tratados imediatamente e 48hs após a cirurgia que foram acompanhados por 7 dias e tiveram o volume de infarto medido por ressonância magnética e o tecido cerebral coletado para análises bioquímicas. Nossos resultados sugerem que os lipossomas foram capazes de aumentar a eficácia da Ang-(1-7) tanto quando administrados imediatamente quanto 48 horas após a isquemia. Esse nanossistema foi capaz de reduzir o volume de infarto e melhorar a capacidade funcional dos animais, mesmo com a utilização de uma dose menor de Ang-(1-7). Além disso, também é sugerido possível interação dos lipossomas com as células da BHE e liberação da Ang-(1-7), tanto a nível das células endoteliais, quanto do parênquima cerebral, para ação da sua função neuroprotetora. Portanto, essa estratégia terapêutica apresenta grande potencial para o tratamento do AVE.

Palavras-chave: Acidente Vascular Encefálico; lipossomas; angiotensina-(1-7); nanopartículas; isquemia, barreira hematoencefálica.



## ABSTRACT

Stroke is one of the leading causes of death and serious long-term disability worldwide. The only therapeutic agent available is tissue-type plasminogen activator (t-PA), however the number of potential patients is limited because of its side effects and narrow therapeutic window. Thrombectomy is another treatment option providing the surgical removal of the brain clot. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], an endogenous peptide from the renin-angiotensin system, has shown neuroprotective effects in models of *in vitro* and *in vivo* ischemia. Ang-(1-7) is rapidly metabolized and to overcome this issue, liposome nanoparticle encapsulation is a valuable approach to prevent degradation of the peptide. Liposomes are vesicles consisting of one or more lipid bilayers surrounding an aqueous compartment. Liposomes are biodegradable, biocompatible, and are able to increase drug efficacy in models of stroke, therefore the use of liposomes as Ang-(1-7) carriers to the Central Nervous System is an asset for ischemic stroke therapy. In this study, Ang-(1-7) encapsulated liposomes were synthesized for the stroke treatment. CD1 mice underwent temporary middle cerebral artery occlusion (MCAO) and immediately or 48h after reperfusion the treatments were intravenously injected. CD1 were also evaluated through a neurological score for functional analyses. The MCAO groups treated immediately after the surgery were euthanized 24h after the surgery and their brains were removed for stroke infarct volume quantification and immunofluorescence. Besides these groups, another group of animals also received treatment immediately or 48h after surgery and were maintained for 7 days. Infarct volume in the brains was measured by magnetic resonance image and the brains were removed for biochemistry analyses. Overall, the results showed that liposomes were able to increase Ang-(1-7) efficacy when administered immediately or 48 after ischemia. Ang-(1-7) liposomes decreased de infarct volume and improved the animal's function using a smaller dose of Ang-(1-7). Moreover, we also suggested liposome interaction with brain endothelial cells and Ang-(1-7) release in the BBB and also in brain parenchyma explaining its neuroprotective effect. Therefore, the therapeutic strategy suggested in this work presents high potential for stroke treatment.

Keywords: Stroke; liposome; angiotensin-(1-7); nanoparticles; ischemia; blood brain barrier.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Imagem representativa do AVE isquêmico e hemorrágico.....	22
<b>Figura 2:</b> Imagem esquemática representando a fisiopatologia do AVE e os eventos celulares que ocorrem após a isquemia.....	28
<b>Figura 3:</b> Imagem esquemática da barreira hematoencefálica com os principais componentes.....	31
<b>Figura 4:</b> Imagem esquemática do eixo principal e alternativo do sistema Renina Angiotensina.....	38
<b>Figura 5:</b> Imagem esquemática dos órgãos e funções exercidas pela Ang-(1-7) nesses órgãos.....	40
<b>Figura 6:</b> Imagem esquemática representando as possíveis modificações da membrana lipossomal.....	47
<b>Figura 7:</b> Métodos para aumentar a chegada de lipossomas no SNC.....	56
<b>Figura 8:</b> Imagem representativa da ação da isquemia na BHE aumentando a passagem dos lipossomas.....	60
<b>Figura 9:</b> Imagem esquemática resumindo a produção de lipossomas vazios e com Ang-(1-7).....	65
<b>Figura 10:</b> Imagem esquemática dos vasos da região inferior do cérebro exemplificando o caminho percorrido pelo fio de oclusão durante a cirurgia de MCAO.....	68
<b>Figura 11:</b> Delineamento experimental dos grupos que passaram pela cirurgia de MCAO e foram acompanhados 24 horas após a cirurgia (agudo).....	69
<b>Figura 12:</b> Delineamento experimental dos grupos que passaram pela cirurgia de MCAO e foram acompanhados 7 dias após a cirurgia (crônico).....	70
<b>Figura 13:</b> Gráfico do volume de infarto e escore neurológico 24h após cirurgia de MCAO e tratamento.....	78
<b>Figura 14:</b> Gráfico da média dos pesos de todos os animais de todos os grupos experimentais que foram acompanhados por 7 dias após a cirurgia de MCAO.....	80
<b>Figura 15:</b> Gráfico do volume de infarto e volume total do cérebro dos animais acompanhados cronicamente.....	81

<b>Figura 16:</b> Gráfico do volume de infarto distribuído ao longo das fatias cerebrais em todos os grupos MCAO.....	82
<b>Figura 17:</b> Escore neurológico dos animais acompanhados por 7 dias após a cirurgia de isquemia.....	85
<b>Figura 18:</b> Gráfico da análise de estresse oxidativo no hemisfério isquêmico 7 dias após o tratamento.....	85
<b>Figura 19:</b> Gráfico da análise de citocinas pró (IL1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) no hemisfério isquêmico 7 dias após o tratamento.....	87
<b>Figura 20:</b> Gráfico da análise qualitativa da imunofluorescência no cérebro de animais que passaram por cirurgia de MCAO/Sham e foram tratados com Ang-(1-7) lipo imediatamente após a cirurgia.....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Fatores de risco modificáveis e não modificáveis para o AVE.....	24
<b>Tabela 2:</b> Tipos de nanopartículas.....	44
<b>Tabela 3:</b> Caracterização de lipossomas vazios e lipossomas incorporando Ang-(1-7).....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	artéria carótida comum
ACE	artéria carótida externa
ACI	artéria carótida interna
ACM	artéria cerebral média
ADC	coeficiente de difusão aparente
AEPO	asialo-eritropoetina
ANG I/II	angiotensina I/II
ANG-(1-7)	angiotensina-(1-7)
AT <sub>1/2</sub>	receptor de angiotensina do tipo I/II
ATP	adenosina trifosfato
AUC	área sobre a curva
AVE	acidente vascular encefálico
BHE	barreira hematoencefálica
COL	colesterol
Dil	1,1'dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOTAP	N-[1-(2,3-Diol Iloxi)propil]-N,N,Trimetilamônio metilsulfato
DSPC	diestearoil-fosfatidilcolina
DSPE-PEG	diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietileno glicol
ECA	enzima conversora de angiotensina
e/i NOS	óxido nítrico sintase endotelial/induzida
FDA	Food and Drug Administration
GABA	ácido gama-aminobutírico
GLU	glutamato
GLUT1	transportador de glicose
HDL	high-density lipoprotein
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IL-	interleucina
iRMN	imagens por ressonância magnética nuclear
LIPO	lipossomas

LUV	vesículas unilamelares grandes
MCAO	oclusão da artéria cerebral média
MDA	malondialdeído
mNSS	escore neurológico severo modificado
MRP-1	proteína-1 resistente a múltiplas drogas
NF- $\kappa$ B	fator nuclear kappa B
NGS	soro normal de cabra
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
PBS	tampão fosfato
PDI	índice de polidispersão
PE	fosfatidiletanolamina
PEG	polietilenoglicol
PFA	paraformaldeído
P-gp	glicoproteína P
RES	sistema reticuloendotelial
RGD	ácido arginilglicilaspártico
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigênio
RPM	rotações por minuto
SHp	stroke homing peptide
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido desmutase
SRA	sistema renina angiotensina
SUV	vesículas unilamelares pequenas
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
T <sub>c</sub>	temperatura de transição de fase
TC	tomografia computadorizada
TE	taxa de encapsulação
TIA	AVE transitório
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
t-PA	ativador de plasminogênio tecidual

TTC

trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
<b>2.1 Acidente Vascular Encefálico</b> .....	21
2.1.1 <i>Dados epidemiológicos e classificação</i> .....	21
2.1.2 <i>Tipos de diagnóstico</i> .....	25
2.1.3 <i>Fisiopatologia do AVE</i> .....	27
2.1.4 <i>Barreira Hematoencefálica</i> .....	30
2.1.5 <i>Tratamentos disponíveis atualmente</i> .....	33
2.1.6 <i>Estratégias terapêuticas no AVE e a dificuldade translacional existente</i> .....	35
<b>2.2 Sistema Renina Angiotensina</b> .....	36
2.2.1 <i>Classificação e descrição</i> .....	36
2.2.2 <i>Eixo alternativo e Angiotensina-(1-7)</i> .....	38
2.2.3 <i>Ações da Angiotensina-(1-7) no organismo</i> .....	40
2.2.4 <i>Angiotensina-(1-7) e AVE</i> .....	42
<b>2.3 Nanopartículas</b> .....	43
2.3.1 <i>Classificação e tipos</i> .....	43
2.3.2 <i>Lipossomas</i> .....	45
2.3.2.1 <i>Classificação</i> .....	45
2.3.2.2 <i>Tipos de lipossomas</i> .....	48
2.3.2.2.1 <u>Composição dos lipossomas</u> .....	48
2.3.2.2.2 <u>Método de preparo dos lipossomas</u> .....	51
2.3.2.3 <i>Lipossomas no SNC</i> .....	53
2.3.2.4 <i>Estratégias para ultrapassar a BHE utilizando lipossomas</i> .....	54
2.3.2.5 <i>Lipossomas e AVE</i> .....	58
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	63
<b>3.1 Justificativa</b> .....	63
<b>3.2 Objetivos</b> .....	63
3.2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	63
3.2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	63



<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	64
<b>4.1 Preparo e caracterização das formulações de lipossomas</b> .....	64
4.1.1 <i>Preparo dos lipossomas vazios</i> .....	64
4.1.2 <i>Preparo dos lipossomas incorporando Ang-(1-7)</i> .....	65
4.1.3 <i>Caracterização dos lipossomas</i> .....	66
<b>4.2 Animais</b> .....	67
<b>4.3 Cirurgia de oclusão da artéria cerebral média (MCAO)</b> .....	67
<b>4.4 Cuidados pós-operatórios</b> .....	70
<b>4.5 Coloração com TTC</b> .....	71
<b>4.6 Imagens por ressonância magnética nuclear</b> .....	71
<b>4.7 Escore Neurológico</b> .....	72
<b>4.8 Análises bioquímicas com Ang-(1-7)</b> .....	72
<b>4.9 Imunofluorescência</b> .....	73
4.9.1 <i>Obtenção das imagens de imunofluorescência</i> .....	74
<b>4.10 Análise Estatística</b> .....	75
<b>5. RESULTADOS</b> .....	75
<b>5.1 Caracterização dos lipossomas quanto ao tamanho e a taxa de encapsulação</b> .....	75
<b>5.2 Protocolo agudo dos animais MCAO/Sham</b> .....	76
<b>5.3 Protocolo crônico dos animais MCAO/Sham</b> .....	78
<b>5.4 Análises bioquímicas</b> .....	84
<b>5.5 Imunofluorescência</b> .....	87
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	90
<b>6.1 Caracterização dos lipossomas quanto ao tamanho e a taxa de encapsulação</b> .....	90
<b>6.2 Protocolo agudo dos animais MCAO/Sham</b> .....	92
<b>6.3 Protocolo crônico dos animais MCAO/Sham</b> .....	94
<b>6.4 Análises bioquímicas</b> .....	98
<b>6.5 Imunofluorescência</b> .....	99
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	101
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	102

## 1 INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é considerado uma das maiores causas de morte e de incapacidade em adultos no mundo e principalmente em países subdesenvolvidos (Krishnamurthi et al., 2020). O AVE é caracterizado por distúrbios neurológicos causados por alterações do fluxo sanguíneo cerebral (Sacco et al., 2013). De acordo com o tipo de alteração, os AVEs podem ser classificados em duas grandes categorias: isquêmico e hemorrágico (figura 1).

O AVE isquêmico ou isquemia cerebral, correspondente a aproximadamente 87% dos casos, é caracterizado pela interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo em consequência de uma obstrução nas artérias que irrigam determinada área do cérebro. Essa obstrução pode ser causada por um trombo (coágulo) ou um êmbolo (Luo et al., 2017).

O AVE hemorrágico, menos comum ocorrendo em aproximadamente 13% dos casos, é dividido em duas formas, o intracranial e o subaracnóide. O AVE hemorrágico intracranial, mais comum, ocorre quando há o rompimento de uma artéria causando extravasamento de sangue para o parênquima cerebral (S. A. Mayer & Rincon, 2005). Esse rompimento pode ser causado principalmente por hipertensão, má-formação de vasos e angiopatia amilóide. Já o extravasamento de sangue subaracnóideo, menos comum, normalmente é causado por algum trauma ou ruptura de aneurisma (Rafii & Hillis, 2006).

Como o AVE isquêmico é o mais comumente encontrado entre os pacientes, nossos estudos têm como foco esse tipo de AVE. Os danos causados pela isquemia resultam de uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos que vão se desenvolvendo ao longo do tempo. Sendo que os mecanismos principais dessa cascata de eventos são a excitotoxicidade glutamatérgica, despolarizações na região próxima ao infarto, estresse oxidativo, inflamação e apoptose celular (figura 2). Todos esses eventos se desenvolvem rapidamente no centro da lesão (core) onde há uma redução drástica do fluxo sanguíneo e morte celular intensa. Entre o centro da lesão e a parte saudável do cérebro, há a região de penumbra, onde a redução do fluxo sanguíneo é significativa, mas não drástica e, portanto, as células não morrem instantaneamente, o que a torna uma região com possibilidade de recuperação (Dirnagl et al., 1999).

A pesar de todo conhecimento sobre a fisiopatologia dessa doença, as únicas formas de tratamento encontradas são por meio de medicamentos fibrinolíticos ou a retirada mecânica do coágulo, ou seja, todos esses tratamentos consistem na eliminação do coágulo e restauração do fluxo sanguíneo (Wardlaw et al., 2012).

Contudo, um aspecto muito importante e que deve ser considerado é que, quando o sangue retorna ao tecido, também é restabelecido o fornecimento de oxigênio e nutrientes, ou seja, energia. E isso faz com que cascatas de reações intracelulares, ainda adormecidas pela falta de energia, sejam deflagradas culminando em uma extensa morte celular (Iadecola & Anrather, 2011) com aumento do core, ou seja, das células mortas.

Portanto, é necessária a neuroproteção para que consigamos reduzir a perda de tecido cerebral diante dos danos causados pela isquemia e pela reperfusão. Nesse contexto, a literatura vem demonstrando amplos estudos com diversas substâncias ativas neuroprotetoras que apresentam bons resultados nos experimentos laboratoriais, mas não conseguem os mesmos resultados nas fases clínicas do desenvolvimento (Bae & Sun, 2011; Bruch et al., 2019; Ginsberg, 2008). Uma das razões sugeridas para explicar a ineficácia dessas substâncias em testes clínicos é a presença da barreira hematoencefálica (BHE) como obstáculo para a passagem de várias substâncias para o tecido cerebral. Essa barreira é uma estrutura dinâmica, composta principalmente por células endoteliais cerebrais e é responsável por controlar a passagem de substâncias do sangue para o cérebro (Banks, 2016). Dessa forma, ela impede que muitas substâncias, desde tóxicas até possíveis fármacos, cheguem ao ambiente cerebral.

Por isso, diversas alternativas vêm sendo desenvolvidas no intuito de possibilitar a passagem pela BHE e a chegada da substância ativa no seu alvo. Uma alternativa amplamente estudada é o uso de nanopartículas. Nanopartículas são sistemas coloidais compostos por polímeros ou lipídeos, de tamanho variando entre 10 a 1000 nm, sendo os mais comuns entre 50 a 300 nm (T.-T. Zhang et al., 2016).

As nanopartículas têm se tornado um dos maiores focos de estudo quando se diz respeito à entrega de fármacos no SNC, devido a características únicas que essas partículas possuem, como tamanho nanométrico, capacidade de incorporação de alta quantidade de fármaco, maior estabilidade nos fluidos corporais e nas condições de armazenamento, capacidade de liberação controlada e alta especificidade de ação,

entre outros (Alam et al., 2010; Gastaldi et al., 2014). Dentre elas, os lipossomas também têm chamado atenção.

Os lipossomas fazem parte da primeira geração de nanocarreadores (Budai & Szógyi, 2001) e são definidos como vesículas compostas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios que separam o compartimento aquoso interior do meio também aquoso externo (Ahmed et al., 2019). Os fosfolipídios que compõem as vesículas dos lipossomas também são encontrados no organismo humano, o que os confere suas principais características que são a biocompatibilidade e biodegradabilidade (Lamichhane et al., 2018; Masserini, 2013). Além disso, como os lipossomas possuem uma bicamada lipídica e um compartimento aquoso interno, eles conseguem encapsular tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas, o que engloba a maior parte das substâncias terapêuticas disponíveis (Gulati et al., 1998; Wen et al., 2012). E, uma vez encapsuladas nos lipossomas, essas substâncias são protegidas contra eventos fisiológicos como degradação, inativação imunológica e química e clearance plasmático, o que aumenta o tempo de circulação das mesmas (Bozzuto & Molinari, 2015; van der Valk et al., 2015). Devido a todas essas vantagens, os lipossomas ganharam o interesse de diversos membros da comunidade científica sendo um dos sistemas nanocarreadores mais estudados para doenças do Sistema Nervoso Central (SNC) (Bozzuto & Molinari, 2015).

No contexto do tratamento do AVE, uma substância que vem demonstrando resultados positivos é a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]. A Ang-(1-7) é um peptídeo que faz parte do eixo alternativo do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) (figura 4), e diversos estudos têm mostrado que não só esse eixo está alterado durante a isquemia (J. Lu et al., 2013), mas também que o uso desse peptídeo como tratamento trouxe resultados promissores em modelos diversos de isquemia cerebral (Mecca et al., 2011; Regenhardt, Bennion, et al., 2014; Regenhardt, Mecca, et al., 2014). Contudo, os efeitos desse heptapeptídeo são de curta duração, uma vez que ele é rapidamente metabolizado nos meios biológicos (Jiang et al., 2013).

Por isso, esse trabalho tem o intuito de utilizar os lipossomas como sistema nanocarreador de Ang-(1-7) para o tratamento do AVE e também avaliar possíveis ações e interações desse nanossistema no cérebro.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

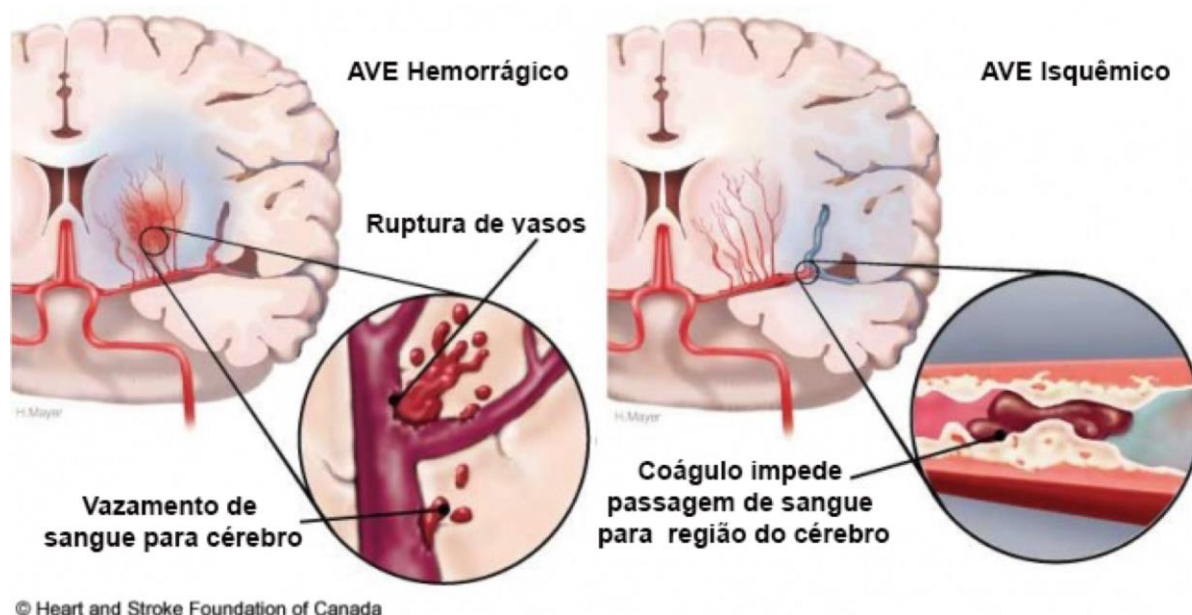
### 2.1 Acidente Vascular Encefálico

#### 2.1.1 Dados epidemiológicos e classificação

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é a segunda causa de morte e a terceira de incapacidade em adultos no mundo todo (Krishnamurthi et al., 2020). Segundo dados mais recentes da American Heart Association, a cada ano, aproximadamente 795 mil pessoas apresentam um caso novo ou recorrente de AVE. No mundo todo até 2017, a prevalência do AVE era de 104.2 milhões de pessoas, sendo 82.4 milhões referentes a casos de AVE isquêmico e 27.2 milhões de AVE hemorrágico. A taxa de mortalidade em 2017 foi de 6.2 milhões de pessoas. Nos Estados Unidos, a cada 19 mortes uma é devida ao AVE (*Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association | Circulation*, n.d.). No Brasil, somente em 2017 foram registradas 101.1 mil mortes devidas ao AVE, segundo o Ministério da Saúde (*Lembrado hoje, Dia Mundial do AVC serve de alerta à população*, 2020).

O tipo mais comum de AVE é o isquêmico, onde ocorre a redução do fluxo sanguíneo para alguma região do cérebro. Essa redução se dá, na maioria dos casos, devida a oclusão de artérias, muito raramente ocorrem oclusões de veias. Já o AVE hemorrágico é menos comum e mais perigoso e ocorre devido a ruptura de um vaso sanguíneo e extravasamento de sangue para o tecido (figura 1) (Campbell & Khatri, 2020). Além desses dois tipos existem outras classificações que vêm se tornando mais comuns como o AVE transitório (também chamado de ataque isquêmico transitório - TIA), nesse caso, a ocorrência da isquemia e a resolução dos sintomas ocorrem dentro de 24 horas, muitas vezes deixando menos sequelas do que os outros tipos de AVE já citados. Mas pacientes que já sofreram de TIA têm mais chances de desenvolverem um outro tipo de AVE, portanto esses pacientes devem ser acompanhados e monitorados.

**Figura 1:** Imagem representativa do AVE isquêmico (direita) causado pelo bloqueio do vaso sanguíneo e do AVE hemorrágico (esquerda) causado pela ruptura do vaso sanguíneo e extravasamento do sangue.



Tanto para os AVEs isquêmicos, quanto hemorrágicos, o tipo de sintoma desenvolvido vai depender da região do cérebro afetada, podendo o paciente apresentar sintomas distintos, como paralisias, dificuldade de fala, movimentos, entre outros. No entanto, alguns sintomas tendem a ser comuns em ambos os casos sendo estas alterações na face, fraqueza nos braços e dificuldade de fala.

Além desses tipos também podemos citar outras duas classificações que são os AVEs criptogênicos e os AVEs no tronco encefálico. AVEs criptogênicos são aqueles que não tem uma causa clara definida. É estimado que 1 a cada 4 AVEs são criptogênicos (*Cryptogenic Stroke | NEJM*, n.d.; Yaghi et al., 2017). Já o AVE no tronco encefálico apresenta sintomas que dependem da região comprometida. Como o tronco encefálico é responsável por atividades básicas do Sistema Nervoso Central, tais como percepção, pressão arterial e respiração, a falta de oxigênio nessa região pode afetar qualquer uma dessas funções. Esse tipo de AVE também pode causar a “Locked-In Syndrome” onde há paralisia total e os pacientes afetados conseguem mexer somente os seus olhos. Mas, apesar disso, não há um conjunto de sintomas característicos desse tipo de AVE que facilite a sua identificação (*Brain Stem Stroke | American Stroke Association*, n.d.; Teasell et al., 2002).

Há alguns fatores de risco que podem contribuir para a maior ocorrência do AVE e, apesar de existirem diferenças entre esses fatores de acordo com o tipo de AVE, muitos deles são comuns para todos os AVEs. Os fatores de risco, por sua vez, também podem ser divididos em dois grandes grupos, os modificáveis e os não modificáveis (Boehme et al., 2017). Os não modificáveis, também chamados de marcadores de risco, incluem idade, sexo, raça/etnia e fatores genéticos (tabela 1). O AVE é mais prevalente na população idosa, apesar de serem relatados aumentos da incidência de AVE entre pessoas de 20 a 54 anos (George et al., 2011). Mulheres têm maior risco de sofrerem um AVE quando mais novas, mas na população mais idosa, o risco aumenta em homens (Kapral et al., 2005). Quanto a raça/etnia os negros apresentam maiores riscos de ocorrência de AVE, assim como os hispânicos/latino americanos (Cruz-Flores et al., 2011). E por fim, fatores genéticos também entram como fatores não modificáveis e eles podem também estar relacionados com idade, sexo e raça (Boehme et al., 2017).

Já entre os fatores modificáveis podemos citar hipertensão, diabetes mellitus, cardiopatias, dislipidemia, sedentarismo e dieta/nutrição, consumo de álcool, tabagismo dentre outros (tabela 1). A hipertensão é o fator modificável mais importante e um dos mais relevantes, sendo que, nesse caso, o aumento da pressão arterial está diretamente relacionado com o aumento nas chances de ocorrência de AVE. A prevalência de hipertensão também é maior na população idosa, então esses fatores podem se sobrepor (Boehme et al., 2017).

Diabetes mellitus é um fator de risco independente e está associada há um aumento nas chances de ocorrência de AVE. No caso da diabetes, ao contrário da hipertensão, a ocorrência do AVE é maior em pessoas mais novas e negras. Isso pode ser inclusive uma explicação para o aumento da incidência de casos de AVE na população mais nova (Kissela et al., 2005). Algumas cardiopatias como fibrilação atrial podem estar associadas com má circulação sanguínea o que pode aumentar o risco de ocorrência de AVE (Boehme et al., 2017).

Quanto a dislipidemia a relação é um pouco mais complicada sendo observada relação entre o aumento dos níveis de colesterol com aumento na ocorrência de AVE, mas ao mesmo tempo o aumento de HDL (high-density lipoprotein) é relacionado com a redução na ocorrência de AVE (Horenstein et al., 2002; Sacco et al., 2001). Além disso, os níveis de colesterol parecem estar relacionados com maior incidência de

AVE isquêmico em grandes artérias, uma vez que níveis totais de colesterol estão inversamente relacionados com a ocorrência de AVE hemorrágico. Sedentarismo, Dieta/Nutrição, consumo de álcool elevado e tabagismo apresentam correlação positiva com o aumento do risco de ocorrência de AVE. Em todos esses casos, o aumento da ocorrência se dá também pelo fato desses comportamentos induzirem outros tipos de doenças como hipertensão, diabetes e dislipidemia (Boehme et al., 2017).

**Tabela 1:** Fatores de risco modificáveis e não modificáveis para o AVE (Boehme et al., 2017).

### FATORES DE RISCO AVE

<b>NÃO MODIFICÁVEIS</b>	Idade
	Sexo
	Raça/etnia
	Fatores Genéticos
<b>MODIFICÁVEIS</b>	Hipertensão
	Diabetes Mellitus
	Cardiopatias
	Dislipidemia
	Sedentarismo
	Dieta/Nutrição
	Consumo de Álcool
	Tabagismo, etc.



### 2.1.2 Tipos de diagnóstico

Quando se diz respeito ao AVE, é muito comum a expressão “tempo é cérebro”. É estimada uma perda de até 1.9 milhões de neurônios por minuto após a isquemia (Saver, 2006). Como ainda não existem muitas opções terapêuticas disponíveis para proteção do tecido cerebral após o AVE, o diagnóstico rápido e eficaz é fundamental para o estabelecimento da melhor estratégia terapêutica, de modo a evitar menor perda de tecido cerebral. As técnicas de diagnóstico têm não somente uma fundamental importância na análise da situação cerebral permitindo a diferenciação entre AVE isquêmico e hemorrágico, mas também na identificação de possíveis causas do AVE, a fim de possibilitar a escolha da melhor abordagem terapêutica para cada caso. Os exames diagnósticos também são muito importantes para a exclusão de outros tipos de acometimentos cerebrais, como enxaquecas, que apresentam sintomas parecidos com os do AVE (Vilela & Rowley, 2017).

Em muitos casos os pacientes só chegam a ir para uma unidade de saúde muitas horas depois da ocorrência do AVE, o que limita em parte as ações. Mas mesmo nesse caso, e também de pacientes que sofreram uma isquemia transitória, devem ser feitos exames de imagem. No caso de pacientes que sofreram TIA, esses exames são essenciais para a prevenção da ocorrência de novos AVEs (Kamalian & Lev, 2019).

No contexto do AVE, as técnicas de diagnóstico mais utilizadas são os exames de imagem. Dentre eles, a tomografia computadorizada (TC), a angiografia por tomografia computadorizada e a ressonância magnética. A tomografia computadorizada sem contraste é indicada para todos os pacientes de AVE como forma de exclusão ou confirmação de hemorragia. Esse é um passo muito importante porque uma vez determinada a presença ou não de hemorragia as medidas a serem tomadas são distintas. A angiografia é utilizada para ter acesso a artérias maiores e vasos colaterais e assim determinar o local da oclusão. E por fim, a ressonância magnética, técnica mais precisa, pode ser utilizada para determinar a área do cérebro afetada e perdida devido ao AVE (Kamalian & Lev, 2019).

A tomografia computadorizada sem utilização de contraste, apesar de ser uma técnica menos sensível, não apresentando características típicas da isquemia nas primeiras 3 horas após início dos sintomas para alguns pacientes (Chalela et al.,

2007), ainda é utilizada para detecção das primeiras modificações causadas pela isquemia, principalmente para a confirmação da presença ou não de hemorragias. Esse tipo de informação é de extrema importância na tomada de decisão do uso de agentes trombolíticos para a dissolução de um possível trombo que está ocluindo o vaso ou da indicação para retirada manual do trombo. Dentre os primeiros sinais que podem ser observados com a TC sem o uso de contraste, podemos citar a perda de diferenciação entre massa cinzenta e branca (Kidwell & Hsia, 2006). A TC também pode ajudar na identificação de um trombo proximal e acessar o nível de dano que pode ser causado por coágulos por meio da detecção de sinais de vasos hiperdensos (uma medida específica, mas menos sensível sobre coagulação intravascular).

A angiografia por tomografia computadorizada é uma técnica mais precisa que permite a identificação do comprometimento de um vaso do círculo de Willis (conjunto de artérias que suprem o cérebro e estão dispostas no formato de um círculo) que pode ter sido ocluído. Como esse tipo de exame fornece imagens mais nítidas dos vasos sanguíneos é possível identificar estenoses ou oclusões em porções mais distais dos vasos (Berkhemer et al., 2016). Assim como na TC sem contraste, a angiografia por TC também consegue identificar as características do coágulo e assim determinar o tratamento ou não com agentes trombolíticos (Meyne et al., 2015).

Por fim, a ressonância magnética (RM) é o padrão ouro para detecção e delineamento do núcleo do infarto por meio da imagem por difusão, na qual é detectado o movimento das partículas de água presentes no tecido cerebral. A imagem por difusão é altamente sensível (88-100%), específica (95-100%) e precisa (95%) na detecção e delineamento do infarto mesmo sem devida perfusão (Kamalian & Lev, 2019). Durante a isquemia há restrição na movimentação de moléculas de água no tecido cerebral afetado e a RM por imagem de difusão, que vai se basear no movimento browniano das moléculas, consegue detectar exatamente isso. Por isso, ela é capaz de identificar a região isquêmica minutos depois da oclusão, e, nesse caso, a isquemia é representada na imagem por uma região mais clara comparada com o resto do tecido cerebral.

A imagem por difusão possui um componente baseado na intensidade do sinal de T2 e normalmente por meio dessa imagem é possível observar uma associação entre um sinal mais claro representando menor difusão das moléculas (maior restrição de movimento). Contudo, em algumas imagens, as regiões mais claras, ao invés de

indicar um movimento molecular reduzido, podem na verdade estar indicando o componente T2 (que também pode aparecer como pontos mais claros). Nesse caso, a utilização do mapa do coeficiente de difusão aparente (ADC), que reflete uma função linear da difusibilidade, em escalas de cinza pode ajudar na distinção entre uma região mais clara associada a uma lesão isquêmica ou somente ao componente T2 (Chilla et al., 2015).

Portanto, a imagem por RM é capaz de definir o núcleo do infarto sendo bastante importante como forma de se determinar um bom ou mau prognóstico do paciente. Dessa forma, pacientes que apresentam menor núcleo de infarto são mais indicados para tratamento com agentes trombolíticos, enquanto pacientes com maior núcleo de infarto têm mais propensão para hemorragia e por isso não são indicados para tratamento com trombolíticos (Leslie-Mazwi et al., 2016).

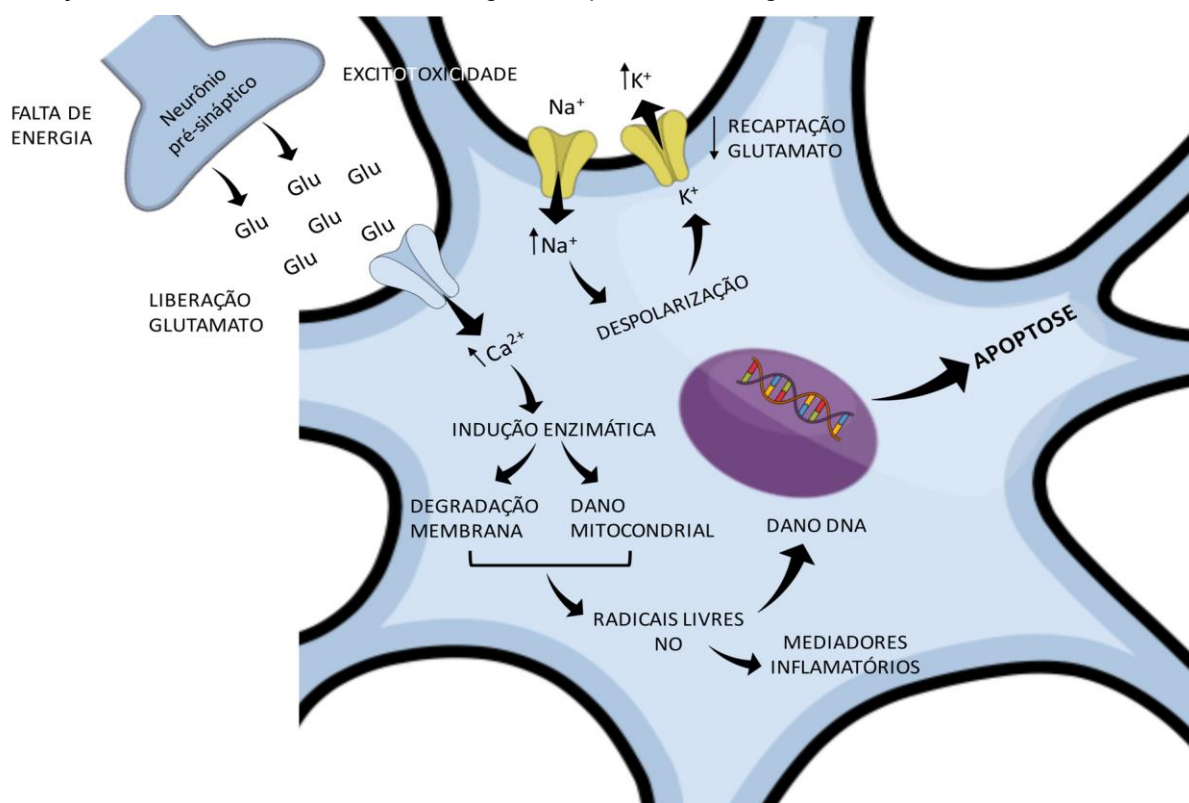
### 2.1.3 Fisiopatologia do AVE

Após a redução na entrega de oxigênio e nutrientes devido a redução do fluxo sanguíneo causada pela isquemia, uma série de eventos a nível celular se iniciam. Primeiramente, a redução no nível de oxigênio e glicose causa uma queda na produção de ATP e conseqüentemente uma redução de energia. Essa falta de energia, por sua vez, impede que os neurônios sejam capazes de manter o gradiente transmembrana, que é essencial na sinalização neuronal (Campbell et al., 2019). Portanto, um dos primeiros eventos que ocorrem após a isquemia é esse prejuízo na sinalização dos neurônios e isso leva a uma transmissão defeituosa de comandos para os membros e órgãos periféricos, o que se reflete nos principais sintomas observados em pacientes após a isquemia e que já foram citados aqui como alterações na face, na fala e nos movimentos dos braços.

Devido à falta de energia, a retirada dos neurotransmissores da fenda sináptica também é prejudicada, uma vez que essa é uma atividade dependente de energia. Dessa forma, a concentração dos neurotransmissores (inclusive do glutamato) irá aumentar. O glutamato então ativará ininterruptamente seu receptor, promovendo a despolarização neuronal (Campbell et al., 2019). Essa despolarização generalizada que ocorre após o evento isquêmico é chamada de despolarizações na região do peri-infarto. Além disso, a ativação dos receptores de glutamato, como o NMDA (N-metil-D-aspartato), leva a um aumento da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) que

é reforçado também pela despolarização celular. O aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  induzirá uma série de eventos cálcio-dependentes, como estresse oxidativo (Love, 1999) e ativação de processos de morte celular como apoptose, necrose e autofagia (figura 2).

**Figura 2:** Imagem esquemática representando a fisiopatologia do AVE e os eventos celulares que ocorrem após a isquemia. Após falta no suprimento de energia há acúmulo de glutamato (GLU) na fenda sináptica, que então ativa seus receptores de forma constante levando a despolarização celular e cascatas intracelulares que tem início com o aumento do  $Ca^{2+}$  levando a liberação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO) que por sua vez, levam a danos celulares e indução da liberação de mediadores inflamatórios. Figura adaptada de Dinargl et al., 1999.



Ainda como consequência da ação excessiva do glutamato (excitotoxicidade glutamatérgica) há entrada de sódio ( $Na^+$ ) e cloreto ( $Cl^-$ ) nos neurônios através de canais de íons monovalentes. Como o influxo desses íons é maior que o efluxo de potássio ( $K^+$ ), a água também entrará nos neurônios por força osmótica seguindo o gradiente de concentração. Isso levará a ocorrência de edema, permitindo que esse excesso de água possa ser detectado por imagens de ressonância magnética, como já discutido, o que é essencial para o diagnóstico do AVE (Dinargl et al., 1999).

A iniciação do estresse oxidativo é influenciada pelos altos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  que ativam a enzima óxido nítrico sintase neuronal que irá então produzir óxido nítrico (NO). O óxido nítrico, por sua vez, poderá reagir com ânions superóxido levando a produção de espécies reativas capazes de causar danos teciduais (Iadecola, 1997). A mitocôndria também contribui no estresse oxidativo, uma vez que a permeabilidade de sua membrana aumenta levando a um edema mitocondrial, queda na produção de ATP e uma explosão na produção de espécies reativas (Kristián & Siesjö, 1998).

A ativação de segundos mensageiros, além do estresse oxidativo e da própria hipóxia, em resposta ao aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , levam à ativação de genes pró-inflamatórios induzindo a síntese de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B), dentre outros. Com isso, há a produção de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IL1- $\beta$  (interleucina 1 beta) pelas células cerebrais afetadas (Hopkins & Rothwell, 1995). Consequentemente, ocorre a indução de moléculas de adesão na membrana de células endoteliais, como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular – 1) e P-selectina (L. I. Zhang et al., 1998). Essas moléculas de adesão são então capazes de interagir com neutrófilos que se aderem ao endotélio, atravessam a parede vascular e entram no parênquima cerebral. Macrófagos e monócitos também são recrutados se tornando as células predominantes, 5 a 7 dias após a isquemia (Iadecola, 1997). Mais citocinas inflamatórias são produzidas ativando células cerebrais, como astrócitos e micróglia, que também farão parte do processo inflamatório.

Durante a isquemia não só os neurônios são afetados, mas também outras células cerebrais como astrócitos, oligodendrócitos e pericitos. Astrócitos são ativados também por ação do glutamato, podendo se apresentar em dois estados diferentes de ativação, o fenótipo pró-inflamatório (A1) e o imunomodulatório (A2) que podem afetar negativamente ou positivamente (modo protetor) o tecido cerebral (Liddelow et al., 2017; Tarassishin et al., 2014). Já para os oligodendrócitos, é sabido que seus níveis, assim como os níveis de células progenitoras de oligodendrócitos, estão reduzidos no núcleo da isquemia (Dewar et al., 2003) e aumentados nas regiões do peri-infarto, o que resulta na remielinização dessa área (Tanaka et al., 2003). Os pericitos são células contráteis que compõem também a barreira hematoencefálica (BHE) e, durante a isquemia, são ativados levando a constrição dos capilares cerebrais. Além disso, também é reportado morte desses pericitos, o que pode levar

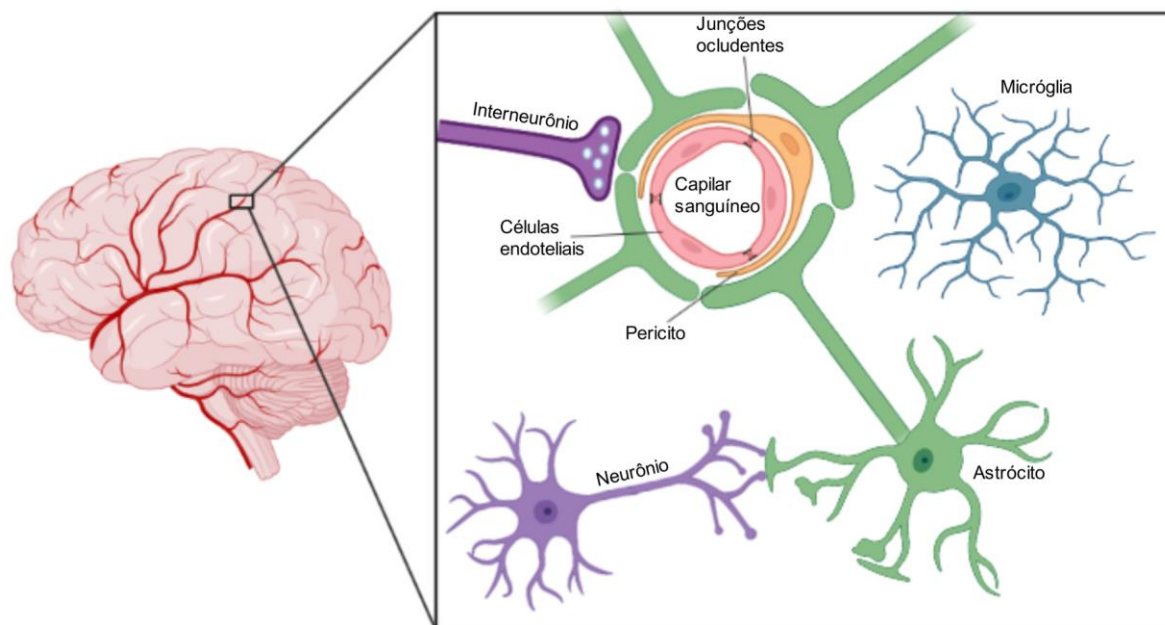
a um dano irreversível de constrição dos capilares cerebrais culminando em danos também na BHE (Hall et al., 2014).

#### *2.1.4 Barreira Hematoencefálica*

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura dinâmica, complexa e adaptável que controla a troca de substâncias entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o sangue. A BHE, apesar de já ser estudada há muito tempo, tem sido desvendada quanto à sua função ano a ano, deixando de ser conhecida somente como uma estrutura que protege o SNC e controla essa passagem de substância para o parênquima cerebral, e se tornando uma estrutura capaz também de responder a insultos patológicos, por meio da comunicação com outras células do SNC. Essa resposta pode inclusive alterar a progressão da doença, sendo benéfica ou não para a recuperação tecidual (Banks, 2016).

A BHE é composta por células endoteliais dos capilares do SNC, que possuem características e estruturas diferentes das demais células endoteliais, além de outras células do SNC que ajudam na composição dessa barreira (figura 3). Na verdade, a própria localização da BHE no SNC é um pouco complexa e nem todas as estruturas do SNC são irrigadas por esses capilares que possuem características diferentes. Além disso, as características celulares podem ser diferentes de acordo com as necessidades da região cerebral (Banks, 2016).

**Figura 3:** Imagem esquemática da barreira hematoencefálica com os principais componentes: células endoteliais com suas junções aderentes, circundadas pelo pericito e pelos astrócitos, e micróglia e neurônios que também têm função importante na BHE. Imagem de autoria própria feita no aplicativo Biorender.



O conceito de unidade neurovascular ajuda na compreensão da BHE e suas funções. A unidade neurovascular consiste nas células endoteliais e em todas as células que interagem com elas. Dessa forma, a unidade neurovascular é composta pelas células endoteliais, micróglia, astrócitos, neurônios, pericitos e as células imunes circulantes (Hawkins & Davis, 2005). A comunicação constante entre essas células ajuda a refinar as funções da BHE de modo a atender às necessidades do cérebro e ainda facilitar a interação entre o cérebro e o resto do organismo (Banks, 2016).

As células endoteliais que compõem a BHE são únicas e diferentes de células endoteliais encontradas em outros órgãos, uma vez que elas não são fenestradas e possuem junções ocludentes entre elas, o que as mantém mais próximas umas das outras (Daneman & Prat, 2015). Dentre as junções ocludentes são encontradas as claudinas, ocludinas, moléculas de adesão e zonas ocludentes que limitam a passagem de substâncias via paracelular (Abbott, 2005; Abbott et al., 2010). Além disso, as células endoteliais do SNC também apresentam menores níveis de transcitose quando comparadas com outras células endoteliais, o que restringe

também o movimento transcelular de moléculas por essas células (Coomber & Stewart, 1985). Os pericitos e astrócitos, assim como alguns interneurônios, tem como função manter a estrutura física das células endoteliais formando uma barreira (Abbott et al., 2006; Daneman et al., 2010).

Os astrócitos são células da glia que ajudam no suporte e proteção de neurônios, regulando a concentração de neurotransmissores e de íons, de modo a manter a homeostase neuronal (Rodríguez-Arellano et al., 2016). Além disso, astrócitos também são capazes de interagir com células endoteliais através de suas projeções finais que circundam os capilares cerebrais (Abbott et al., 2006). Os astrócitos ainda apresentam papel importante no suporte da integridade da BHE. Estudos demonstraram que moléculas efetoras (hormônios de sistema renina-angiotensina, colesterol, apolipoproteína E) eliminadas por astrócitos têm como função aumentar e manter a impermeabilidade da barreira (Keaney & Campbell, 2015).

Pericitos são células perivasculares que têm como papel a regulação do diâmetro dos capilares cerebrais, do fluxo sanguíneo e dos níveis e secreção da proteína da matriz extracelular (Winkler et al., 2011). Ademais, os pericitos além de terem papel importante na manutenção da BHE durante a fase adulta também desempenham importante função durante a formação da barreira e durante a infância (Keaney & Campbell, 2015).

Já quanto à interação das micróglia, células imunes do SNC responsáveis pela resposta inata, e das células endoteliais e sua contribuição para a homeostase da BHE, pouco é sabido. No entanto, se tem conhecimento do papel importante dessa célula na resposta inflamatória patológica no SNC. A micróglia diante de uma situação patológica, como a isquemia por exemplo, pode se apresentar em dois estados ativos: um pró-inflamatório e um anti-inflamatório. No estado pró-inflamatório, a micróglia será responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias piorando o quadro inflamatório e podendo levar a danos no tecido cerebral. Já no estado anti-inflamatório, a micróglia libera fatores que contribuem na recuperação tecidual após inflamação (H. Wang et al., 2020).

Além de todas essas funções celulares e características das células endoteliais, há ainda mais algumas estruturas que permitem o bom funcionamento da BHE e que explicam porque algumas moléculas conseguem se acumular no SNC e



outras não. Sistemas de transporte ativos de substâncias estão presentes nas células endoteliais podendo transportar moléculas do sangue para o SNC ou do SNC de volta para o sangue. Dentre esses sistemas podemos citar a glicoproteína P (P-gp), um transportador de efluxo do tipo ABC, e as proteínas associadas a resistência à multi-fármacos que estão presentes na superfície apical das células endoteliais (Mercier et al., 2004). Por isso, o número de compostos que conseguem efetivamente atravessar a BHE é muito baixo (resumido a substâncias lipofílicas e pequenas, como oxigênio e gás carbônico) e mesmo substâncias essenciais como a glicose, por exemplo, possuem transportadores específicos que permitem a passagem e entrada dessa substância no tecido cerebral via endocitose mediada por transportador.

### *2.1.5 Tratamentos disponíveis atualmente*

Muito já se sabe sobre o AVE e sua fisiopatologia. Dependendo da região cerebral afetada, o paciente pode apresentar sintomas diferentes podendo estes variar entre paralisias, dificuldade de fala, movimentos entre outros. O tipo de sequela apresentada pelos pacientes além de variar de acordo com a área afetada também pode ser influenciado pela rapidez de resolução do AVE, tanto pelo próprio corpo, quanto por profissionais de saúde. Como, atualmente, não há opções farmacológicas capazes de proteger o cérebro, quanto mais rápido o fluxo sanguíneo for restabelecido, menores serão as consequências causadas pelo AVE.

Apesar de muitos estudos já terem sido desenvolvidos com a intenção de se achar uma opção terapêutica para o AVE, atualmente, apenas um fármaco é autorizado para uso em pacientes que sofreram isquemia. E esse fármaco tem como função restabelecer o fluxo sanguíneo para a área afetada, não tendo nenhuma ação protetora para o tecido cerebral. O t-PA (ativador de plasminogênio tecidual) é um agente trombolítico aprovado pelo FDA desde 1996 (Zivin, 2009). Portanto, uma vez administrado ele atuará sobre a fibrina, presente no coágulo que está obstruindo o vaso sanguíneo, promovendo a ativação do plasminogênio. O plasminogênio então será convertido em plasmina, uma enzima proteolítica, que é capaz de lisar a fibrina, dissolvendo assim o coágulo (Jilani & Siddiqui, 2021).

Contudo, t-PA possui uma janela terapêutica muito pequena e só pode ser administrado até 4-5 horas após a ocorrência do AVE, o que reduz em muito o número de pacientes que podem receber esse tipo de tratamento para menos de 5% do total

afetado pelo AVE (D'Souza et al., 2021). Além disso, pacientes com maior risco de hemorragia também não podem fazer uso desse agente e já é reportado que o t-PA pode promover a morte de células endoteliais da BHE e causar neurotoxicidade. Sendo assim, o aumento nas chances de ocorrência de hemorragia unidos a baixa eficácia de recanalização em grandes artérias reduz em muito o uso desse agente (Hacke et al., 2008; P. Patel et al., 2020). Por isso, o número de pacientes que realmente se beneficia desse tratamento é bastante baixo e mesmo quando o tratamento é eficaz, como não há neuroproteção, a recuperação do paciente ainda vai depender muito da resposta do seu organismo e de outros tipos de terapias como a fisioterapia.

Além do t-PA, uma outra alternativa terapêutica ainda focando na resolução rápida da oclusão, é a retirada mecânica do coágulo ou trombo por meio da trombectomia. Essa cirurgia permite a retirada de trombos aloçados em vasos sanguíneos maiores e ela só pode ser realizada em pacientes relativamente saudáveis e nas primeiras 16 a 24 horas após a ocorrência do AVE, sendo, nesse caso, mais eficaz que o t-PA (Powers et al., 2018). A trombectomia possibilitou o aumento do número de pacientes com AVE que podem ser tratados, mas ainda há algumas limitações, como por exemplo, o acesso a hospitais onde essa cirurgia é realizada (Bruch et al., 2019).

Até então, todas as alternativas terapêuticas citadas aqui estão relacionadas ao AVE isquêmico, que por ser o mais comum entre pacientes, acaba sendo também o mais estudado. No caso do AVE hemorrágico, procedimentos paliativos podem ser feitos, mas ainda não há nenhum tratamento ou procedimento eficaz reportado (Fagan et al., 2013; S. A. Mayer & Rincon, 2005; Power et al., 2003). A estratégia mais utilizada nesses pacientes, quando possível, é a redução da pressão arterial numa tentativa de reduzir e/ou conter o sangramento e assim reduzir os danos causados pela hemorragia e as sequelas observadas nos pacientes. Contudo, estudos mostram que a redução na pressão arterial até 3 a 6 horas após a ocorrência do AVE não é eficaz para reduzir o número de mortes ou de sequelas mais severas (Anderson et al., 2013; Hankey, 2017; Qureshi et al., 2016).

### *2.1.6 Estratégias terapêuticas no AVE e a dificuldade translacional existente*

Já é de conhecimento da comunidade científica que após o AVE há uma recuperação espontânea que independe de estratégias terapêuticas. Resumidamente, alguns estudos já demonstraram o crescimento ou nascimento de novas sinapses e dendritos (Jones & Schallert, 1992; R. L. Zhang et al., 2008), remodelamento de axônios e angiogênese (Ding et al., 2008; Seevinck et al., 2010; Teng et al., 2008), aumento na expressão de genes e proteínas relacionados a crescimento (S. Li & Carmichael, 2006) e aumento da excitabilidade neural mediada pelos receptores NMDA e GABA (Que et al., 1999; Redecker et al., 2002). Além disso, essas mudanças podem ser classificadas em três grandes etapas. A primeira ocorre nas primeiras horas após o AVE e representa uma janela de oportunidade na tentativa de salvar o tecido cerebral pouco afetado (penumbra) via reperfusão ou estratégias neuroprotetoras. A segunda etapa tem início dias ou até semanas após o AVE e corresponde a iniciação de reparação cerebral, na qual mecanismos de reparação são mais robustos. E a terceira etapa está relacionada a uma fase mais crônica de reparação quando o cérebro está mais estável, no que diz respeito a eventos endógenos de reparação, mas modificações na estrutura e função de regiões cerebrais ainda são possíveis (Cassidy & Cramer, 2017).

Apesar dessa recuperação espontânea, o uso de alguma estratégia terapêutica, como algum agente neuroprotetor, traria grandes benefícios podendo reduzir as sequelas ou até o número de mortes relacionadas ao AVE. Contudo, como já citado, ainda não há nenhum agente terapêutico disponível para uso clínico, apesar do extenso número de estudos pré-clínicos presentes na literatura. E dentre esses estudos é possível encontrar diferentes tipos de agentes terapêuticos que podem atuar em diferentes níveis da cascata fisiopatológica que ocorre após o AVE. Como alguns exemplos podemos citar antagonistas de receptores de glutamato que atuam na redução da excitotoxicidade glutamatérgica (Wu & Tymianski, 2018), agentes antioxidantes e anti-inflamatórios que tem como função agir contra o estresse oxidativo e a reação inflamatória estabelecida, respectivamente (Chamorro et al., 2016; P. Li et al., 2018; Yu et al., 2020).

Mesmo com todo o conhecimento atual sobre o AVE, sua fisiopatologia e possíveis opções terapêuticas, nenhum estudo pré-clínico de agentes

neuroprotetores conseguiu, até o momento, ser também efetivo em estudos clínicos levando ao seu uso em pacientes. Alguns autores discutem o porquê disso e algumas hipóteses são levantadas, como o uso de animais mais novos, sendo que o AVE ocorre com mais frequência na população idosa; o tempo de administração do agente terapêutico, uma vez que muitos trabalham administram logo depois da ocorrência do AVE e na prática raramente isso pode ser feito; a presença da BHE como um obstáculo impedindo a entrada das substâncias ativas, além também de fatores mais estatísticos, como a publicação de trabalhos cheios de viés, o que pode reduzir o poder real de resultados satisfatórios (Cassidy & Cramer, 2017; Schmidt-Pogoda et al., 2020).

De uma maneira geral, é possível perceber que muito ainda deve ser feito no que diz respeito à busca por novas alternativas terapêuticas para o AVE. Nesse contexto, a introdução de outras estratégias e/ou o estudo de outros potenciais sistemas veiculando possíveis substâncias ativas neuroprotetoras é de extrema importância. Dessa forma, tanto o estudo do Sistema Renina Angiotensina, quanto o uso de nanopartículas como agentes carreadores de fármacos para o SNC podem trazer grandes contribuições na busca por novas opções terapêuticas.

## **2.2 Sistema Renina Angiotensina**

### *2.2.1 Classificação e descrição*

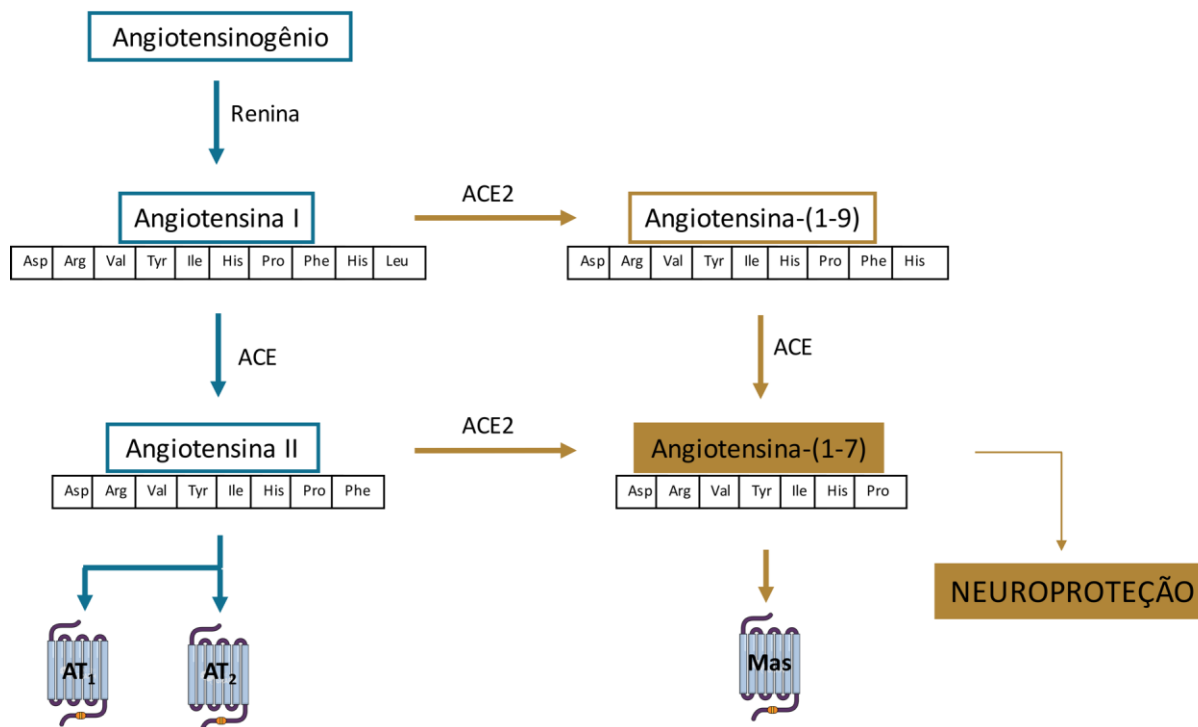
O sistema Renina Angiotensina, descoberto a mais de 120 anos atrás, é um dos reguladores cardiovasculares mais potentes presentes no nosso organismo, além de também ser um importante alvo de muitos tratamentos farmacológicos (R. A. S. Santos et al., 2019). Esse sistema tem início no Angiotensinogênio que é convertido em Angiotensina I pela ação da renina, enzima produzida pelos rins. A Angiotensina I, um peptídeo de 10 aminoácidos, é, por sua vez, transformada em Angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Por muitos anos acreditou-se que o único peptídeo ativo desse sistema era a Ang II que pode agir tanto nos receptores de angiotensina do tipo I e tipo II, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, respectivamente.

O Angiotensinogênio é um membro da família serpina, portanto um potencial inibidor enzimático (Heit et al., 2013). Os seus níveis plasmáticos podem ser aumentados pela ação de corticosteróides, estrogênio, hormônios tireoidianos e pelos níveis de Angiotensina II (Verdecchia et al., 2008). A renina é secretada pelas células

granulares do fígado (Kopp, 2011) e também é considerada como hormônio devido a sua ação sinalizadora (Brown, 2007). A queda da pressão arterial, níveis baixos de cloreto de sódio e atividade do Sistema Nervoso Simpático levam à expressão dessa enzima (Drenjančević-Perić et al., 2011). O decapeptídeo Angiotensina I é convertido em Angiotensina II nos capilares pulmonares, células endoteliais e células epiteliais dos rins pela ECA. Para que essa conversão ocorra dois aminoácidos C terminais são retirados da Angiotensina I (S. Patel et al., 2017).

A ação da Angiotensina II no receptor  $AT_1$  leva à vasoconstrição, aumento no consumo de moléculas de água e retenção de sódio ( $Na^+$ ). Além de também exercer funções fisiopatológicas associadas ao estresse oxidativo, fibrose, hipertrofia e inflamação. Por muitos anos essa foi a visão desse sistema, que desempenha um papel muito importante na homeostase do nosso organismo. Contudo, há aproximadamente 30 anos atrás, algumas descobertas mudaram um pouco a visão sobre esse sistema. A primeira descoberta foi sobre a ação da Angiotensina II no receptor  $AT_2$ , que gera estímulos opostos à sua ação em  $AT_1$ , resultando em vasodilatação, ações anti-inflamatórias e antiapoptóticas (R. A. S. Santos et al., 2019). E a segunda descoberta foi um novo peptídeo, ao qual foi dado o nome de Angiotensina-(1-7), uma vez que ele é composto por 7 aminoácidos. A descoberta desse novo peptídeo também levou à descoberta de um novo eixo do sistema renina angiotensina que passou então a ser chamado de eixo alternativo (figura 4).

**Figura 4:** Imagem esquemática do eixo principal e alternativo do sistema Renina Angiotensina. O eixo principal (verde) se inicia no angiotensinogênio terminando na angiotensina II. E eixo alternativo (amarelo) tem a angiotensina-(1-7) como peptídeo principal. Adaptado de Santos R.A.S et al., 2018.



### 2.2.2 Eixo alternativo e Angiotensina-(1-7)

No eixo alternativo do sistema renina angiotensina existe a presença da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] localizada no centro desse eixo, além de outros peptídeos, enzimas e peptidases (figura 4). A Ang-(1-7) teve sua primeira aparição em 1968 quando Yang, Erdos e Chiang descreveram um heptapeptídeo gerado da Angiotensina II, mas neste momento eles trataram esse peptídeo como um produto final de degradação da Ang II (Yang et al., 1968). Tonnaer e colaboradores chegaram à mesma conclusão que Yang e colaboradores quando eles encontraram o heptapeptídeo em sinaptossomas no cérebro (Tonnaer et al., 1982). Em 1988, Santos e colaboradores examinaram tecidos retirados de cães que tinham sido tratados com enalapril para determinar como esse tratamento poderia afetar o sistema renina angiotensina no cérebro. Durante os experimentos, eles detectaram o heptapeptídeo que foi chamado de Ang-(1-7). O peptídeo continuava sendo formado mesmo depois da adição de um inibidor da ECA, o que significava que a Ang-(1-7) estava sendo formada pela Ang I, mas por uma via diferente da clássica e conhecida, na qual a enzima ECA fazia parte (R. A. Santos et al., 1988).

Contudo, diferente do que até então tinha sido concluído sobre o heptapeptídeo ser um produto de degradação final da Ang II, Santos e colaboradores sugeriram que a Ang-(1-7) seria na verdade um produto biologicamente ativo do sistema renina angiotensina. Também em 1988, Schiavone e colaboradores confirmaram a hipótese de Santos mostrando ações da Ang-(1-7) no hipotálamo, promovendo a liberação de vasopressina (Schiavone et al., 1988). Um ano depois Campagnole-Santos e colaboradores também demonstraram as ações da Ang-(1-7) *in vivo* ao realizarem microinjeções de Ang-(1-7) no núcleo do trato solitário e demonstrarem reduções na pressão arterial dos animais após a injeção (Campagnole-Santos et al., 1989). Muitos outros trabalhos foram sendo realizados desvendando possíveis funções desse novo peptídeo, e em 1994, Santos, Ambühl e colaboradores descreveram o primeiro antagonista da Ang-(1-7), o seu análogo D-Ala<sup>7</sup>-ANG-(1-7) que foi chamado de A-779. A presença de um antagonista foi essencial para a descoberta de outras ações da Ang-(1-7) e também para o posterior achado sobre um receptor específico sobre o qual a Ang-(1-7) possivelmente exercia suas funções (Fontes et al., 1994).

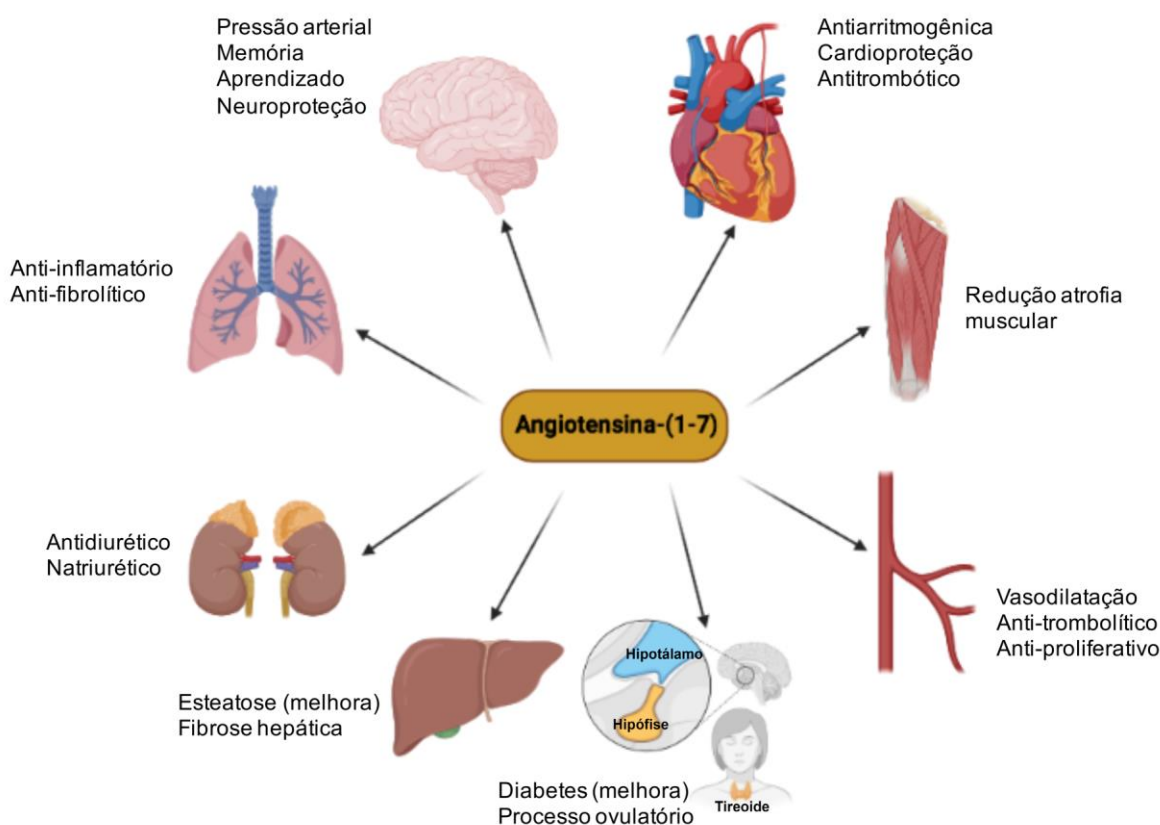
Apesar das evidências sugerindo que a Ang-(1-7) era um peptídeo biologicamente ativo, essa ideia somente ganhou maior atenção da comunidade científica, como um todo, após a descoberta da enzima conversora de angiotensina II (ECA2) e do receptor de Ang-(1-7) MAS. ECA2 é uma carboxipeptidase, produto de uma duplicação da ECA que sofreu uma fusão com a colectrina (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). MAS é um receptor acoplado à proteína G que foi inicialmente descrito em 1968 como um MAS oncogene (Young et al., 1986) e a princípio pensava-se que ele era um receptor da Ang II (Jackson et al., 1988).

Com o passar do tempo, outras enzimas que também fazem parte da formação da Ang-(1-7), foram descobertas e um novo eixo foi formado, o eixo alternativo. Nesse eixo a Ang-(1-7) pode ser formada pela conversão da Ang I ou Ang II pela ação da ECA2 ou de outras peptidases. Além disso, a Ang I ainda pode ser transformada em Ang-(1-9) pela ECA2, que por sua vez, é transformada em Ang-(1-7) pela ECA ou por outras peptidases.

### 2.2.3 Ações da Angiotensina-(1-7) no organismo

Com o intenso estudo do novo peptídeo Ang-(1-7) muitas descobertas foram feitas, relacionadas às suas ações no organismo. Ang-(1-7) vem demonstrando funções em diversos órgãos, incluindo o cérebro, coração, pulmão, rins, fígado, e nos sistemas endócrino, muscular esquelético e nos vasos sanguíneos (figura 5).

**Figura 5:** Imagem esquemática dos órgãos e funções exercidas pela Ang-(1-7) nesses órgãos. A Ang-(1-7) possui influência sobre diversos órgãos no nosso organismo como cérebro, coração, pulmão, rins, fígado, além de também influenciar os músculos esqueléticos, os vasos sanguíneos, e o sistema endócrino. Imagem de autoria própria feita no aplicativo Biorender.



No cérebro, a Ang-(1-7) pode agir como moduladora do barorreflexo, aumentar ou diminuir a pressão arterial, dependendo da região do cérebro em que ela está agindo, diminuir o tônus simpático e aumentar o tônus vagal periférico, além de também apresentar possíveis ações em processos de estresse, memória e aprendizado, e de neuroproteção após a ocorrência de eventos isquêmicos ou hemorrágicos no cérebro (R. A. S. Santos et al., 2018).



No coração, a Ang-(1-7) exerce efeitos anti arritmogênicos, nos vasos coronários ela promove a vasodilatação, ela pode também exercer efeitos cardioprotetores após a ocorrência de um infarto e evitar a disfunção cardíaca. Nos vasos sanguíneos, a Ang-(1-7) tem efeito vasodilatador, também potencializando o efeito da bradicinina nos vasos, além de também induzir efeitos anti-proliferativos e anti-trombolíticos na vasculatura (R. A. S. Santos et al., 2018).

Nos rins, a Ang-(1-7) pode exercer tanto efeitos na vasculatura, quanto no tecido. Os efeitos no tecido variam podendo ser relacionados a ações antidiuréticas ou natriuréticas dependendo da situação do experimento, além da redução de proteinúria. E nos vasos sanguíneos dos rins, ela também vai exercer um efeito vasodilatador dependente de óxido nítrico. No pulmão, a Ang-(1-7) vem demonstrando efeitos anti-inflamatórios, anti-fibrinolíticos, além de reduzir a pressão pulmonar e arterial (R. A. S. Santos et al., 2018).

No sistema endócrino, as ações da Ang-(1-7) podem influenciar os efeitos do sistema renina angiotensina no sistema cardiovascular, no metabolismo e no controle eletrolítico. Além disso, a Ang-(1-7) também exercerá funções na diabetes reduzindo a nefropatia diabética, a resistência à insulina, protegendo o desenvolvimento de retinopatia diabética e acelerando a melhora de ferimentos. A Ang-(1-7) também exercerá efeitos sobre o sistema reprodutor feminino atuando no processo ovulatório, estimulando a produção de estradiol e aumentando a eficácia ovulatória. Além de também exercer importante função durante a gravidez como participação nos eventos iniciais da gravidez incluindo angiogênese, apoptose, crescimento e também em eventos mais tardios como função no fluxo sanguíneo uteroplacental. Por fim, no sistema reprodutor masculino, a Ang-(1-7) também desempenhará funções na regulação da espermatogênese e da ereção (R. A. S. Santos et al., 2018).

Dentre os efeitos da Ang-(1-7) no sistema muscular esquelético podemos citar a redução de atrofia muscular, redução de apoptose e efeitos antifibróticos, sendo uma possível opção para tratamento de doenças musculares e caquexia. No fígado, a Ang-(1-7) desempenha efeitos benéficos incluindo melhora na esteatose não hepática e inflamação, na fibrose hepática e sensibilidade a insulina (R. A. S. Santos et al., 2018).

#### 2.2.4 Angiotensina-(1-7) e AVE

O papel do Sistema Renina Angiotensina no AVE vêm sendo estudado e já é de conhecimento da comunidade científica que, quando o eixo clássico (ECA/Ang II/AT<sub>1</sub>R) é mais estimulado, pode haver uma piora dos processos fisiopatológicos no pós-AVE, devido aos seus efeitos vasoconstritores, pró-inflamatórios, pró-fibróticos e a estimulação do estresse oxidativo (Wright & Harding, 2013). Estudos mostram que animais com a expressão aumentada dos genes humanos da renina e do angiotensinogênio apresentam maiores volumes de infarto (Inaba et al., 2009). Além disso, a Ang II foi capaz de aumentar a resposta contrátil em segmentos isolados da artéria cerebral média após isquemia, via ação em receptores AT<sub>1</sub>, prejudicando a reperfusão (Stenman & Edvinsson, 2004).

De modo contrário, evidências sugerem que o eixo alternativo tenha ação protetora no AVE, tanto pela ação da Ang II no receptor AT<sub>2</sub>, quanto pela ação da Ang-(1-7) no receptor MAS induzindo a vasodilatação e reduzindo processos inflamatórios, estresse oxidativo e eventos apoptóticos (Gaspari et al., 2012; Regenhardt, Bennion, et al., 2014). Estudos mostram que, após isquemia induzida pela oclusão da artéria cerebral média, níveis de AT<sub>2</sub>R estão aumentados na região peri-infarto do córtex de ratos (Zhu et al., 2000) e que após isquemia global os níveis desse receptor também estão aumentados no córtex e hipocampo desses animais (Makino et al., 1996). Além disso, níveis de ECA2 e do receptor MAS também demonstraram aumento após oclusão da artéria cerebral (MCAO) em ratos, o que foi associado com um concomitante aumento de Ang-(1-7), tanto no cérebro, quanto no plasma (J. Lu et al., 2013).

Em 2011, Mecca e colaboradores mostraram, pela primeira vez, o efeito do tratamento com Ang-(1-7) exógena após um evento de isquemia. Os resultados comprovam que a administração de Ang-(1-7), anteriormente à ocorrência de isquemia, foi capaz de reduzir o volume de infarto dos animais, e que esse efeito foi revertido após uso do A-779, antagonista do receptor MAS, sugerindo uma ação da Ang-(1-7) por meio desse receptor (Mecca et al., 2011). Também foi demonstrada ação neuroprotetora da Ang-(1-7) em eventos hemorrágicos, com redução no número desses eventos, aumento na perspectiva de vida dos animais e melhora da função neurológica (Regenhardt, Mecca, et al., 2014).

A ação neuroprotetora da Ang-(1-7) vêm sendo explicada, principalmente por seus efeitos anti-inflamatórios, vasodilatadores e sua ação reduzindo o estresse oxidativo. Estudos mostraram que a administração central da Ang-(1-7) atenuou o aumento de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/MAS foi capaz de reduzir o estresse oxidativo reduzindo os níveis de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (Iadecola et al., 1995), uma molécula pró-oxidativa, e do fator nuclear kappa B (NF-κB) (Jiang et al., 2012). Os efeitos vasodilatadores da Ang-(1-7) e sua possível contribuição para sua ação neuroprotetora vêm sendo investigados e essa hipótese têm sido confirmada por alguns estudos nos quais a Ang-(1-7) foi capaz de aumentar os níveis de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e óxido nítrico durante o AVE (Jiang et al., 2014; Y. Zhang et al., 2008) e também de melhorar a função endotelial (Fraga-Silva et al., 2013; Rentzsch et al., 2008).


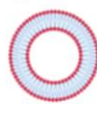
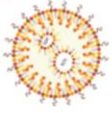







Contudo, a Ang-(1-7) é rapidamente metabolizada/transformada uma vez administrada em animais, e por isso, muitos estudos injetam esse peptídeo diretamente no cérebro. Portanto, diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas para aumentar o tempo de circulação desse peptídeo, permitindo a sua ação no SNC mesmo após administração menos invasiva. Uma dessas estratégias é o uso de nanopartículas.

## **2.3 Nanopartículas**

### *2.3.1 Classificação e tipos*

Nanopartículas são sistemas coloidais compostos por polímeros ou lipídeos, de tamanho variando entre 10 a 1000 nm, sendo os mais comuns entre 50 a 300 nm (T.-T. Zhang et al., 2016). De uma maneira bem ampla, as nanopartículas podem ser classificadas de duas formas: sintéticas e biológicas. Dentre as nanopartículas biológicas, podemos citar as vesículas extracelulares. Essas vesículas são secretadas pelas células e contém biomoléculas (microRNAs, proteínas e lipídeos) capazes de modular atividades celulares à distância (de Abreu et al., 2020). Já dentre as sintéticas, encontramos um grande número de exemplos como nanocápsulas, nanogéis, lipossomas, micelas, além de várias outras. As nanopartículas sintéticas ainda podem ser subdivididas em nanopartículas lipídicas, poliméricas, inorgânicas e metálicas (Bernardo-Castro et al., 2021), além das nanopartículas de carbono (tabela 2).

**Tabela 2:** Tipos de nanopartículas

TIPOS DE NANOPARTÍCULAS			
Vesículas Extracelulares	Vesícula extracelular 		
Nanopartículas Lipídicas	Lipossomas 	Nanopartículas sólidas 	
Nanopartículas Poliméricas	Polímero 	Dendrímero 	Micelas 
Nanopartículas Inorgânicas	Nanopartícula de ouro 		
Nanopartículas de Carbono	Nanotubo 	Fulereo 	Grafeno 

As nanopartículas compostas por lipídeos incluem os lipossomas, vesículas esféricas constituídas por bicamadas de fosfolipídios e esteróides, além de outros surfactantes; as nanopartículas lipídicas sólidas são compostas por lipídeos sólidos estabilizados por vários surfactantes com boa estabilidade física e tolerabilidade; os carreadores lipídicos não estruturados são formados por uma mistura de lipídios líquidos e sólidos, o que leva à formação de uma nanoestrutura específica com grande capacidade de armazenamento e integração entre as substâncias ativas, e os lipídeos gerando complexos entre eles (Tapeinos et al., 2017; Wilczewska et al., 2012).

As nanopartículas poliméricas podem ser obtidas pelo uso de polímeros sintéticos ou naturais, podendo apresentar diferentes formas e tamanhos (Saraiva et al., 2016). Dentre essas nanopartículas podemos citar as micelas poliméricas (Y. Lu et al., 2019), os dendrímeros (S. D. Santos et al., 2018), os nanogéis poliméricos (Cui et al., 2016), além de outros (Lombardo et al., 2020). Por fim, as nanopartículas inorgânicas incluem nanopartículas de metais. Os óxidos de certos metais possuem

características paramagnéticas funcionando como bons agentes de contraste (Praça et al., 2018).

Dentre as nanopartículas de carbono, podemos citar os fulerenos, nanotubos de carbono e grafeno como as mais estudadas (Fernandes et al., 2018). Fulerenos são estruturas esféricas compostas por átomos de carbono. Nanotubos de carbono são formados por uma camada de átomos de carbono em forma cilíndrica gerando um nanotubo. E, por fim, os grafenos também são formados por uma camada de átomos de carbono, mas, no caso desses nanomateriais, a camada é aberta. Essas nanopartículas são bastante utilizadas em áreas como comunicação, energia, aeroespacial e também nanomedicina (De Volder et al., 2013). Mas, para seu uso em sistemas biológicos, é necessário que mudanças na superfície dessas nanopartículas sejam feitas para aumentar sua dispersão e garantir sua biocompatibilidade. De uma forma geral, essas mudanças podem conferir características funcionais aos nanomateriais diversificando suas aplicações biológicas que podem ir desde o uso como sensores e biomarcadores até como carreadores de fármacos (Fernandes et al., 2018).

Para que as nanopartículas sejam utilizadas como carreadores de fármacos, elas devem possuir as seguintes características: não serem tóxicas, serem biodegradáveis e biocompatíveis, terem diâmetro de preferência menor que 200 nm; serem estáveis no sangue, sem haver agregação; a partícula deve evitar o sequestro pelo SFM (sistema fagocitário mononuclear) e, conseqüentemente, ficar por tempo prolongado na circulação; devem ser capazes de encapsular pequenas moléculas, peptídeos ou ácidos nucleicos; seus excipientes devem induzir o mínimo de degradação química ou mudanças estruturais na droga; devem ser capazes de promover uma liberação controlada da substância encapsulada; e, finalmente terem um processo de produção econômico e eficiente (T.-T. Zhang et al., 2016).

## 2.3.2 Lipossomas

### 2.3.2.1 Classificação

Os lipossomas são a primeira geração de nanocarreadores (Budai & Szógyi, 2001) tendo seu nome derivado de duas palavras gregas *lipos* (gordura) e *soma* (corpo). Bangham em 1965 (Bangham et al., 1965) criou o conceito de lipossoma e alguns anos depois Gregoriadis sugeriu a utilização dos lipossomas como um sistema

nanocarreador de fármacos (Gregoriadis et al., 1974). Por meio de seus estudos, Bangham percebeu que lipídios, em seu formato sólido, tem a capacidade de se auto rearranjar quando colocados em contato com quantidade suficiente de água ou alguma solução aquosa. Isso demonstra a ocorrência de interações não favoráveis entre os lipídeos e moléculas de água gerando efeitos de repulsão que guiam o rearranjo espontâneo desses lipídeos (Sopyan et al., 2020).

Os lipossomas são vesículas compostas classicamente por uma bicamada de fosfolipídeos que separa um compartimento aquoso interno do meio aquoso externo, similar ao que é visto nas membranas celulares (Ahmed et al., 2019). Os fosfolipídeos podem ser de origem natural ou sintética, mas todos eles são compostos por um grupo polar ligado a duas cadeias apolares, o que os confere a classificação de compostos anfifílicos (Frézard, 1999). Muitos desses fosfolipídeos podem ser encontrados no organismo humano, o que favorece duas de suas principais características: biocompatibilidade e biodegradabilidade (Lamichhane et al., 2018; Masserini, 2013).

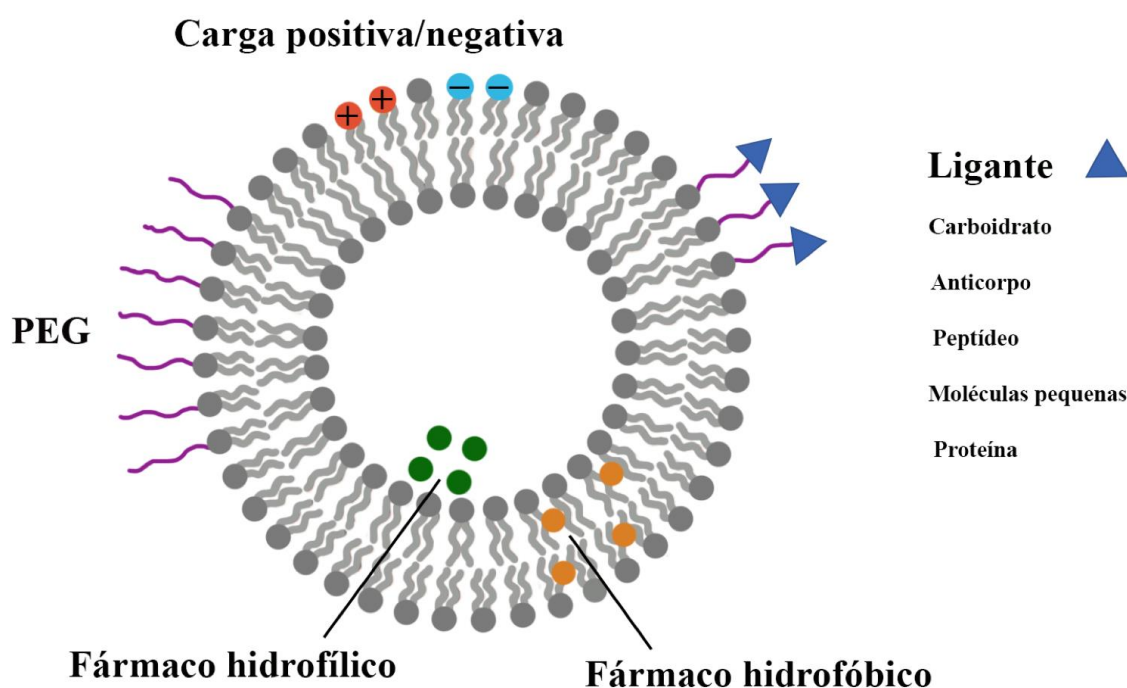
Os fosfolipídios são caracterizados por uma temperatura de transição de fase ( $T_c$ ), na qual a membrana passa de uma fase gel (cadeia hidrocarbonada do lipídio em estado ordenado) para uma fase cristal-líquido (moléculas ficam com movimentos mais livres e cadeias desordenadas e as cabeças polares tornam-se mais hidratadas). A composição da membrana influencia na  $T_c$ , e dessa forma, membranas compostas por lipídeos diferentes podem possuir níveis de fluidez diferentes, mesmo estando em uma mesma temperatura (Frézard et al., 2005).

Os lipossomas, por possuírem uma bicamada lipídica separando o meio aquoso interno do externo, são capazes de encapsular tanto fármacos hidrofílicos quando hidrofóbicos, ou seja, a maioria dos fármacos existentes (Gulati et al., 1998; Wen et al., 2012). Esse nanossistema também é capaz de encapsular gases, possibilitando a administração intravenosa de compostos gasosos (Fix et al., 2015; Peng et al., 2013). Além disso, uma vez encapsulado, o fármaco é protegido de eventos fisiológicos como degradação, inativação química e imunológica, e clearance, o que prolonga a meia-vida dessas substâncias (Bozzuto & Molinari, 2015; van der Valk et al., 2015).

Outra vantagem desse sistema é a sua versatilidade. Os lipossomas podem variar no seu tamanho, no número de lamelas, na composição dos lipídeos utilizados

na formulação, nos tipos de substâncias acopladas a membrana do lipossoma, e no volume e composição do meio aquoso interno (Frézard et al., 2005). Isso permite com que os lipossomas tenham sua bicamada lipídica e/ou superfície modificada de acordo com os objetivos do estudo (figura 6).

**Figura 6:** Imagem esquemática representando as possíveis modificações da membrana lipossomal. Os lipossomas são vesículas bastante versáteis podendo ser modificadas de diferentes maneiras (adição de PEG, de ligantes ou mudança da carga da membrana) de modo a favorecer a entrega do fármaco em determinado alvo. Retirada de Bruch et al., 2019.



Essa versatilidade permite que os lipossomas apresentem uma entrega alvo-específica dentro do organismo, o que reduz o acúmulo das vesículas em outros órgãos, diminuindo os efeitos adversos. Ainda é possível também, a redução da dose do fármaco administrada, uma vez que há a sua concentração na região desejada, e isso, conseqüentemente, também irá contribuir para uma redução dos efeitos adversos (Bozzuto & Molinari, 2015).

Devido a todas essas características e vantagens, os lipossomas se tornaram um dos nanossistemas mais estudados e de maior sucesso no que se refere à entrega

de fármacos em organismos humanos. Sua utilização como carreador de fármacos para o SNC também tem ganhado cada vez mais destaque.

### 2.3.2.2 *Tipos de Lipossomas*

Os lipossomas podem ser classificados tanto pelo seu método de preparo, quanto pela sua composição, lamelaridade e tamanho. Quanto ao método de preparo, os lipossomas podem ser classificados com base em: método de hidratação do filme lipídico; método de preparo por dispersão do solvente; métodos baseados em fusão ou transformação do tamanho da vesícula preparada; e tecnologia de fluido supercrítica. Quanto à composição dos lipossomas, eles podem ser classificados em: convencionais; de longa duração; sensíveis ao pH; catiônicos; e lipossomas alvo-específico. E quanto à lamelaridade e tamanho, eles podem ser unilamelares ou multilamelares e pequenos ou grandes.

A lamelaridade diz respeito ao número de lamelas ou bicamadas formadas durante o rearranjo espontâneo dos lipídeos, uma vez em contato com uma solução aquosa. Vesículas unilamelares pequenas (SUV) possuem tamanho até 100nm e somente uma bicamada lipídica, e as vesículas unilamelares grandes (LUV) possuem tamanho maior que 100nm e uma bicamada lipídica. Já as vesículas multilamelares podem chegar a diversos micrômetros de tamanho e possuem várias bicamadas lipídicas (Masserini, 2013).

#### 2.3.2.2.1 Composição dos lipossomas

Como já destacado anteriormente, os lipossomas são nanopartículas muito versáteis podendo variar também na composição de sua bicamada lipídica, o que altera algumas de suas características.

Os lipossomas convencionais são os mais antigos e mais simples, em termos de composição. Geralmente são compostos exclusivamente por fosfolipídios naturais ou sintéticos e colesterol. Mesmo sendo simples, eles são capazes de melhorar a biodistribuição de fármacos e sua ação alvo-específica. Formulações de lipossomas convencionais já estão disponíveis para uso clínico no tratamento de doenças causadas por fungos em pacientes imunossuprimidos e vários tipos de câncer (Bruch et al., 2019).

Contudo, quando lipossomas convencionais são administrados via intravenosa ocorrem interações não específicas entre as vesículas e proteínas plasmáticas, e



essa adsorção de opsoninas à superfície dos lipossomas leva a formação de uma estrutura chamada corona. A corona, por sua vez, é rapidamente reconhecida e fagocitada por macrófagos de sistema reticuloendotelial (RES) localizado principalmente no fígado e baço (Immordino et al., 2006; S.-D. Li & Huang, 2009). Como esse processo ocorre de forma rápida, a ação de lipossomas convencionais é prejudicada e por isso novas estratégias foram desenvolvidas para superar esse problema. Nesse contexto, lipossomas de longa duração foram criados pela adição do polietilenoglicol (PEG) à superfície do lipossoma (Allen et al., 1991).

O PEG é capaz de aumentar o tempo de circulação dos lipossomas mediante dois mecanismos: diminuição do nível de agregamento das vesículas por meio da formação de uma camada de hidratação (interação de moléculas de água e PEG) na superfície dos lipossomas aumentando a sua estabilidade; e efeito estérico pela interação com moléculas de água, o que impede o acoplamento de opsoninas à superfície dos lipossomas (Milla et al., 2012). Essa melhora de desempenho proporcionada pela adição do PEG é dependente de sua orientação, sendo normalmente atingido quando os polímeros do PEG estão organizados na conformação de “escova” (polímeros com cadeias menores necessitando maior densidade) (Kenworthy et al., 1995; Onyskiw & Eniola-Adefeso, 2013). Atualmente, na tentativa de aumentar a liberação dos fármacos encapsulados em lipossomas PEGuilados, lipídeos capazes de clivar esse polímero vêm sendo propostos (Milla et al., 2012).

Assim como os lipossomas convencionais, lipossomas PEGuilados também já estão disponíveis para uso clínico, como o Caelyx®, nome comercial da formulação de lipossomas PEGuilados que contém doxorubicina. Quando analisados parâmetros farmacocinéticos como área sob a curva (AUC),  $C_{m\acute{a}x}$  e clearance, os lipossomas PEGuilados apresentaram melhor performance do que lipossomas convencionais (Gabizon et al., 1994; Swenson et al., 2003).

Os lipossomas sensíveis ao pH foram propostos após extenso conhecimento de que há alteração do pH tecidual em situações patológicas, tumores e áreas com inflamação. Durante essas situações, há uma redução do pH tecidual, quando comparado com tecidos normais (Gullino et al., 1965; Lopes et al., 2013). Os lipossomas sensíveis ao pH contêm uma mistura de fosfatidiletanolamina (PE) e um composto anfifílico com um grupo ácido protonável (carregado negativamente em pH

fisiológico) (Batista et al., 2007; Lopes et al., 2013; Simões et al., 2004). Portanto, em pH fisiológico ocorre uma repulsão eletrostática entre a PE e o composto anfifílico possibilitando a formação da bicamada lipídica (Lai et al., 1985; Simões et al., 2004). Mas, em condições ácidas, o grupo ácido do composto anfifílico é protonado resultando na perda da repulsão eletrostática, desestabilização da bicamada lipídica e liberação do fármaco encapsulado (Simões et al., 2004; Torchilin et al., 1993).

A alteração dos lipídios da bicamada lipídica pode ser feita com o intuito de se formarem lipossomas catiônicos. Esse tipo de lipossoma foi proposto após a descoberta de lipídeos catiônicos como o N-[1-(2,3-Diol Iloxi)propil]-N,N,Trimetilamônio metilsulfato (DOTAP), bastante utilizado na formulação de lipossomas catiônicos juntamente com o colesterol e outros lipídeos (Khalil et al., 2018). Essas vesículas vêm sendo utilizadas principalmente para encapsulamento de compostos com carga negativa como DNA e RNA (Lopes et al., 2013).

Por fim, existem também os lipossomas sítio-específico. Esse tipo de lipossoma tem sua superfície funcionalizada de modo a aumentar a especificidade e a quantidade de lipossomas no tecido desejado (Batista et al., 2007; D. Wang et al., 2018). Para isso, diferentes ligantes podem ser acoplados à superfície das vesículas, podendo ser eles proteínas virais, moléculas que interagem com receptores específicos e anticorpos, ou fragmentos de anticorpos (Batista et al., 2007; Lopes et al., 2013).

Lipossomas acoplados a agonistas do receptor de transferrina são um exemplo conhecido de vesículas sítio-específicas, uma vez que essa estratégia é utilizada para aumentar a interação dos lipossomas com o receptor de transferrina, encontrado em células endoteliais de capilares cerebrais, e assim aumentar a passagem dos lipossomas pela BHE (Y. Zhao et al., 2016). Outro exemplo são os imunolipossomas, vesículas acopladas a anticorpos ou fragmentos de anticorpos que visam a interação específica com células que expressam antígenos (D. Wang et al., 2018). Esse acoplamento pode ser feito diretamente aos lipídeos presentes nas bicamadas, mas, com a utilização do PEG e seu efeito estérico, a utilização do polímero acoplado ao ligante de interesse se tornou mais usual (Merino et al., 2018).

Como já destacado anteriormente, a ação alvo-específica dos lipossomas pode levar a um aumento da eficácia e redução da toxicidade uma vez que o lipossoma com o fármaco se concentra na região desejada. Mas apesar das

vantagens e do grande número de estudos, ainda não há lipossomas sítio-específico disponíveis para uso clínico.

#### 2.3.2.2.2 Método de preparo dos lipossomas

Os métodos de preparo dos lipossomas podem influenciar na quantidade de fármaco que é incorporada e sua escolha deve levar em conta as características do fármaco, como hidrofobicidade e hidrofiliabilidade. Uma das técnicas de preparo mais simples é a hidratação do filme lipídico. Esse método se dá pela dissolução dos lipídeos em um solvente orgânico, normalmente clorofórmio ou misturas de clorofórmio e metanol. O solvente é então removido sob vácuo, formando o filme lipídico que é hidratado com uma solução aquosa. Após a hidratação, os lipídeos formam vesículas espontaneamente. Esse método produz lipossomas multilamelares e com tamanhos maiores que 1 micrômetro e por isso outras técnicas precisam ser utilizadas para a redução do tamanho, como a técnica de extrusão ou ultrassonicação (Bangham et al., 1965; Bhatia et al., 2004; Ghanbarzadeh et al., 2013). Ele também é bastante utilizado como método inicial de formação das vesículas para posterior incorporação do fármaco.

O método de preparo por dispersão do solvente é subdividido em dois outros métodos: injeção de éter e injeção de etanol. Na injeção de éter os lipossomas são preparados por meio da dissolução de lipídeos em dietiléter ou uma mistura de metanol e éter, seguido de lenta injeção da mistura a uma solução aquosa que contém o fármaco que será encapsulado. A injeção é feita sob baixa pressão ou a 55-65 °C. Uma desvantagem desse método é a produção de uma população de vesículas de tamanho heterogêneo e também a exposição dos fármacos a altas temperaturas durante o processo (Mathai & Sitaraman, 1987).

A injeção de etanol envolve a utilização do etanol no processo de dissolução dos fosfolipídeos e de colesterol. Utilizando uma seringa, a solução etanólica contendo os lipídeos é injetada a um volume definido de solução aquosa, sob constante agitação. Os lipossomas são espontaneamente formados assim que a solução etanólica entra em contato com a fase aquosa. A suspensão de lipossomas é então mantida em agitação por 15 minutos. Esse processo apresenta várias vantagens como o preparo rápido e simples de vesículas, além de sua reprodutibilidade. Ele também evita alterações oxidativas e degradação de lipídeos, e

é capaz de produzir vesículas unilamelares e pequenas sem a necessidade de extrusão e ultrassonicação (Charcosset et al., 2015; Jaafar-Maalej et al., 2010).

Os métodos baseados em fusão ou transformação do tamanho da vesícula preparada também podem ser divididos em dois: método de congelamento/descongelamento seguido de extrusão; e método da desidratação/reidratação. O método de congelamento e descongelamento é considerado uma técnica para aumento da capacidade de encapsulação do lipossoma, uma vez que ele proporciona uma quebra física de suas membranas pelos cristais de gelo formados durante o congelamento (Supaporn, 2011). Juntamente a esse método, o preparo dos lipossomas é feito pela formação do filme lipídico e incorporação da substância encapsulada ao filme. Uma vez formada a suspensão, as vesículas são congeladas e imediatamente depois descongeladas e submetidas ao vortex. Elas são, então, extrusadas três vezes e mais uma vez passam pelo ciclo de congelamento/descongelamento (seis vezes) seguido de extrusão (oito vezes). Esse método é frequentemente incorporado ao preparo dos lipossomas para aumento da taxa de encapsulação das substâncias hidrossolúveis de interesse (Costa et al., 2014; L. D. Mayer et al., 1985).

O método de desidratação/reidratação também é utilizado como técnica adicional ao preparo dos lipossomas com o objetivo de aumentar a taxa de encapsulação de fármacos. Nessa técnica, os lipossomas são desidratados, por meio de liofilização, por exemplo, e depois o pó é reidratado formando uma solução aquosa contendo o fármaco que será encapsulado. A desidratação leva a formação de um pó sólido contendo os lipídeos em formatos pequenos e subdivididos. Após a reidratação dessa dispersão sólida vesículas oligolamelares são formadas (Gregoriadis et al., 1971, 1990). Esse método foi capaz de aumentar a taxa de encapsulação e a estabilidade de antibióticos (macrolídeos e aminoglicosídeos) e proteínas (Gregoriadis et al., 1990; Mugabe et al., 2006).

Por fim, a tecnologia do fluido supercrítico é um estado no qual o fluido se apresenta intermediário entre as formas gasosas e líquidas. O gás carbônico (CO<sub>2</sub>), em sua forma supercrítica, é um dos gases mais utilizados. Essa técnica é utilizada para a formação de dispersões micronizadas e homogêneas de fosfolipídeos. Colesterol e outros lipídeos são dissolvidos em solvente orgânico. O CO<sub>2</sub> é então adicionado através de spray por tubos capilares em um ambiente de precipitação por

alta pressão. Devido a mudança drástica de temperatura e pressão, o CO<sub>2</sub> chega à sua fase supercrítica. Subsequentemente, o solvente orgânico é evaporado e os lipídeos são extraídos na fase supercrítica, levando à supersaturação desses lipídeos nessa fase e à precipitação do material lipídico. CO<sub>2</sub> é continuamente bombeado ao sistema promovendo a evaporação completa do solvente orgânico, e a transformação dos lipídeos em partículas finas. Esses lipídeos recebem ao final a solução aquosa para formação dos lipossomas. Quando comparada com o preparo tradicional de lipossomas, a tecnologia de fluido supercrítico foi considerada mais sustentável, além de permitir produção em larga escala em condições de boas práticas de produção (Ahmed et al., 2018; Santo et al., 2014).

### 2.3.2.3 *Lipossomas no SNC*

As doenças do Sistema Nervoso Central (SNC) vêm impondo grandes desafios para a população humana sendo uma das áreas que mais requerem estudos. Atualmente, as doenças neurológicas estão entre os maiores causadores de morte e incapacidade no mundo. A contribuição dessas doenças no contexto global vem crescendo e, em 2016, doenças de causa neurológica foram a maior causa de incapacidade ajustada a anos de vida (DALYs – disability-adjusted life-years) atingindo 276 milhões de pessoas, e a segunda maior causa de mortes (9 milhões) (Feigin et al., 2019). Até o momento, o diagnóstico e tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson, Huntington, AVE, câncer cerebral, e epilepsia ainda é um desafio (Barchet & Amiji, 2009).

Muitas dessas doenças ainda não possuem tratamentos efetivos, não pela falta de fármacos, mas devido a dificuldades que essas substâncias enfrentam de passar pela barreira hematoencefálica e atingir o tecido cerebral em quantidades terapêuticas (Neuwelt et al., 2008). Como já discutido anteriormente, a BHE é uma estrutura dinâmica responsável por manter a homeostase cerebral protegendo o tecido de patógenos e substâncias tóxicas (Y. Chen & Liu, 2012). E isso tem grande impacto no tratamento farmacológico de doenças cerebrais, uma vez que quase 100% de grandes moléculas e mais de 98% das pequenas não são capazes de atravessar a BHE (Pardridge, 2007).

Nesse contexto, a nanomedicina vem ganhando espaço, uma vez que ela oferece possíveis soluções para os problemas enfrentados, aumentando o transporte

pela BHE permitindo imagens de diagnóstico e tratamento das doenças do SNC (Holmes, 2013). Dentro da nanomedicina, o uso de lipossomas ainda apresenta diversas vantagens, quando comparado com outros nanossistemas, como por exemplo, o fato deles serem considerados sistemas biocompatíveis fato esse que se confirma com o registro de várias formulações lipossomais terapêuticas aprovadas pelo FDA (Zylberberg & Matosevic, 2016). E quando se trata de estudos translacionais, os lipossomas vêm demonstrando bom desempenho, apresentando baixa toxicidade (Moreno et al., 2015) e imunogenicidade (Ahmed et al., 2018; Bozzuto & Molinari, 2015). Por fim, devido a sua versatilidade, esse nanossistema pode ter suas propriedades modificadas de diferentes maneiras de modo a aumentar a passagem pela BHE o que permite um aumento do potencial terapêutico de muitos fármacos já existentes.

#### *2.3.2.4 Estratégias para ultrapassar a BHE utilizando lipossomas*

A complexidade da BHE, a existência de diferentes níveis de proteínas transportadoras como a P-glicoproteína (P-gp) e a Proteína-1 resistente a múltiplas drogas (MRP-1) e a expressão de enzimas metabólicas limitam a passagem da maioria dos fármacos (Tajes et al., 2014) e também de muitas substâncias fisiologicamente ativas. Por isso, o próprio organismo apresenta diferentes mecanismos de transporte de solutos pela BHE. Substâncias hidrofílicas se difundem pelas junções aderentes via o mecanismo paracelular (extracelular), enquanto as moléculas lipofílicas, como colesterol e álcool, se dissolvem pela membrana lipídica das células, pela via transcelular (Tam et al., 2016). Mas para todas as outras moléculas esse transporte ocorre através de outros mecanismos, como a transcitose mediada por absorção, por receptor ou por carreador e a endocitose mediada por células. Os sistemas nanocarreadores, por sua vez, também fazem uso dessas vias como forma de entrada no SNC (Y. Chen & Liu, 2012; Tam et al., 2016).

Dentre as inúmeras modificações que podem ser feitas nos lipossomas, uma das primeiras estratégias para aumento da passagem pela BHE foi a redução do tamanho dessas vesículas ou a introdução do PEG, uma vez que com essas modificações há aumento do tempo de circulação e conseqüentemente maiores chances de interação e passagem pela BHE (Dinda & Pattnaik, 2013; Gilmore et al., 2008; Pardridge, 1999).

Outra estratégia amplamente utilizada foi o acoplamento de ligantes específicos para receptores presentes nas células endoteliais da BHE na superfície dos lipossomas. Dentre esses ligantes podemos citar o OX26, um ligante para o receptor de transferrina. Esse receptor é encontrado nas células endoteliais dos capilares cerebrais, mas não é amplamente encontrado em células endoteliais do restante do organismo (Jefferies et al., 1984), o que possibilita uma ação mais direcionada e específica. Esse é também o motivo desse tipo de receptor ser um dos mais explorados quando há o intuito de aumentar a passagem pela BHE (Bruch et al., 2019). Outros tipos de receptores encontrados nas células endoteliais da BHE e que são alvo de ligantes utilizados em formulações lipossomais são os receptores de lipoproteína de baixa densidade, transportador de glicose (GLUT1), e receptor de insulina (Gabathuler, 2010; Spuch & Navarro, 2011; Ying et al., 2010).

Uma forma de aumentar ainda mais a especificidade dos lipossomas é por meio do acoplamento de mais de um ligante à superfície das vesículas. Qin e colaboradores demonstraram esse melhoramento através da adição de transferrina e arginina-glicina-ácido aspártico cíclico aos lipossomas com o intuito de aumentar a passagem pela BHE e concentrar no tumor cerebral, respectivamente (Qin et al., 2014).

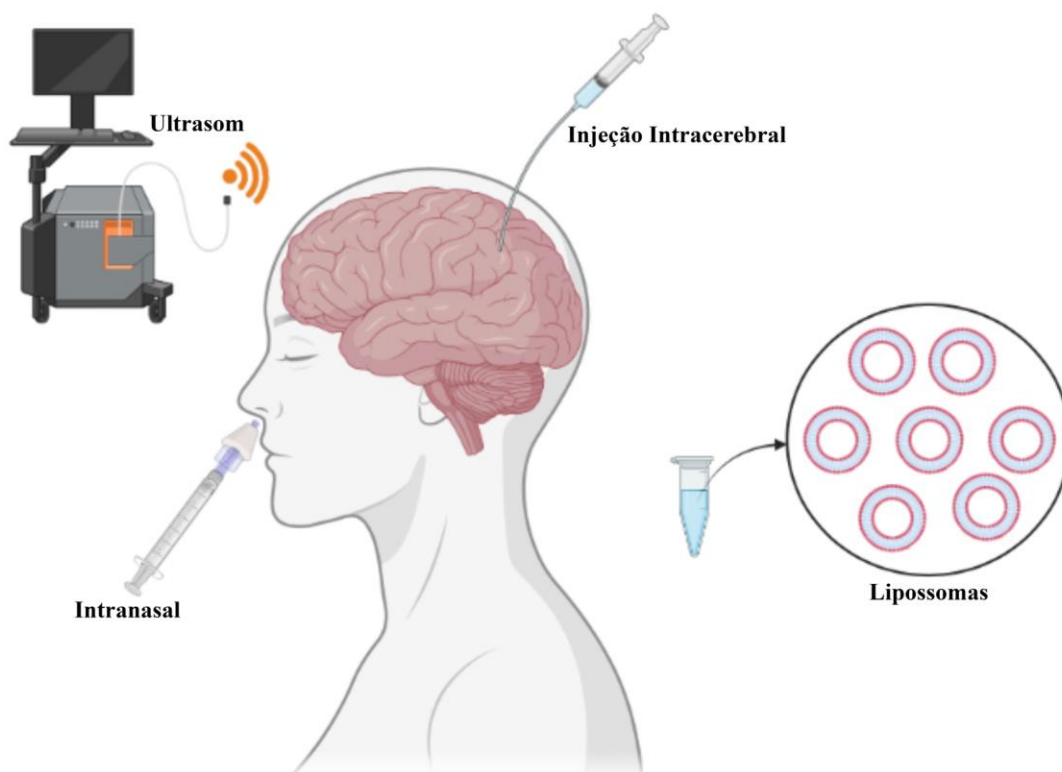
A adição de ligantes à superfície dos lipossomas utiliza o mecanismo de transcitose mediada por receptor para passagem pela BHE. Outro mecanismo amplamente explorado é a transcitose mediada por absorção. Nesse caso, a utilização de lipossomas catiônicos é favorecida, uma vez que eles conseguem interagir com as cargas negativas presentes na membrana das células endoteliais da BHE possibilitando sua passagem (Scherrmann, 2002; Vorbrodt, 1989). Helm e colaboradores utilizaram lipossomas funcionalizados com soro bovino de albumina catiônica e mostraram que essas vesículas eram absorvidas por células endoteliais sugerindo o potencial desse nanossistema para interação com a BHE e entrega de fármacos no SNC (Helm & Fricker, 2015).

Outra estratégia que têm se estudado para aumento da especificidade dos lipossomas com o cérebro é a utilização de lipossomas magnéticos. Lipossomas magnéticos encapsulando fármacos são concentrados no cérebro por aplicação de um campo magnético. Esse tipo de técnica ainda é bastante recente, mas tem o

potencial de concentrar o fármaco no tecido cerebral e reduzir efeitos adversos sistêmicos (L. B. Thomsen et al., 2015; M. Zhao et al., 2012, 2014).

Além de estratégias relacionadas às mudanças na estrutura dos lipossomas, outros tipos de abordagens vêm sendo exploradas com o intuito de aumentar o acúmulo de lipossomas e fármacos no tecido cerebral. Dentre elas podemos citar técnicas invasivas como abertura ativa da BHE e administração de lipossomas diretamente no SNC, e técnicas não invasivas como a administração intranasal (figura 7).

**Figura 7:** Métodos para aumentar a chegada de lipossomas no SNC. Dentre eles existem os mais invasivos como abertura mecânica da BHE com ultrassom ou injeção intracerebral, e os menos invasivos como intranasal. Além disso, os lipossomas também podem ser modificados para aumento da passagem pela BHE. Imagem de autoria própria feita no aplicativo Biorender.



A abertura ativa da BHE pode ser realizada por meio de choque osmótico com o uso de manitol, por exemplo, ou por meio do uso de ultrassom. Essas técnicas vêm sendo utilizadas juntamente com lipossomas para aumentar a passagem dessas nanopartículas e a entrega de fármacos no cérebro (Liu et al., 2014). Em um estudo



de Lin e colaboradores, o ultrassom foi utilizado para abertura da BHE e os lipossomas para entrega de DNA plasmidial no tecido cerebral (Lin et al., 2015). Lipossomas com doxorrubicina em combinação com ultrassom, para a abertura da BHE, também foram utilizados em um modelo de glioblastoma (Y.-Z. Zhao et al., 2015). O trabalho de Sakamoto e colaboradores também mostrou que a utilização de choque osmótico com o uso de manitol para abertura temporária da BHE aumentou a passagem de lipossomas pela BHE e seu acúmulo no tecido cerebral (Sakamoto & Ido, 1993). O equipamento necessário para implementação de ressonância acoplada à técnica de ultrassom no cérebro já está sendo usado em um teste clínico (NCT 00147056) e pode, potencialmente, ser usado juntamente com lipossomas no futuro para a entrega de fármacos ao cérebro. Contudo, a abertura mesmo que temporária da BHE pode causar efeitos adversos e por isso o uso dessa técnica ainda apresenta grandes desvantagens (Rip, 2016).

Uma outra maneira de aumentar a passagem de fármacos pela BHE é injetando a formulação de interesse diretamente no líquido cefalorraquidiano ou no fluido intersticial por meio de injeções no espaço intracerebroventricular ou intratecais. Uma limitação dessa técnica é o alto nível de clearance do SNC sofrido por agentes lipofílicos pequenos, uma vez que moléculas pequenas escapam facilmente da região perfundida do cérebro para a periferia. Por isso, esse tipo de abordagem é mais efetivo para moléculas maiores e hidrofílicas ou quando há utilização de lipossomas no encapsulamento de moléculas menores. Ademais, uma formulação lipossomal para administração intratecal e tratamento de meningite linfomonocitária já está aprovada para uso clínico. A citarabina encapsulada em lipossomas (Depocyt®) é administrada via intratecal e reduz os sintomas causados pela doença (Jahn et al., 2015; Rueda Domínguez et al., 2005). Estudos clínicos mostraram que a citarabina encapsulada em lipossomas melhorou a qualidade de vida de pacientes e possui a mesma ou maior eficácia que tratamentos utilizados para meningite linfomonocitária ou neoplásica. Contudo, apesar dos resultados positivos para tratamento do líquido cefalorraquidiano, ainda é questionada a eficácia dessa via para tratamento de doenças do SNC que necessitam ampla distribuição do fármaco em quantidades terapêuticas no tecido cerebral (Rip, 2016).

A administração de formulações ou fármacos diretamente no tecido cerebral restringe bastante a distribuição do fármaco para locais próximos à injeção. Isso torna

essa técnica mais aplicada para doenças que atingem o cérebro em regiões específicas como os tumores e eventos isquêmicos focais. Administração de formulações lipossomais contendo rênio em tumores cerebrais estão sendo investigadas em testes clínicos (NCT01906385) (Rip, 2016).

Apesar da administração direta no SNC ser uma alternativa, ela é um método bastante invasivo apresentando várias restrições. Dessa forma, opções não invasivas vêm sendo estudadas e uma das mais utilizadas no que diz respeito à administração no SNC é a via intranasal. Essa estratégia não possibilita o aumento da passagem pela BHE uma vez que ela é uma alternativa que não requer a passagem por essa barreira, o que também aumenta a quantidade de fármaco que chega ao tecido cerebral. Portanto, essa via possibilita acesso direto ao SNC através dos nervos olfatório e trigêmeo (Lochhead & Thorne, 2012). Essa passagem de substâncias pela via intranasal se dá pelo transporte intra-axonal lento (intra-neural) ou pela rápida transferência através do espaço perineural que circunda as células neurais chegando até o líquido cefalorraquidiano ou fluido intersticial do cérebro (extra-neuronal ou transporte paracelular) (Dhuria et al., 2010). Esse tipo de administração também permite maior ação local reduzindo efeito sistêmico e consequentes efeitos adversos (Meredith et al., 2015), além de também evitar maior eliminação dos lipossomas encontrados no plasma (Battaglia et al., 2018).

A via intranasal também apresenta como vantagens a mucoadesão e deposição de fármacos, além de melhor absorção das substâncias ativas (Illum, 2000; van Woensel et al., 2013). Nesse contexto, Pashirova e colaboradores utilizaram lipossomas catiônicos via intranasal e mostraram que essa via aumentou o acúmulo dos lipossomas na cavidade nasal, melhorando também o transporte dos mesmos para o cérebro (Pashirova et al., 2018). Zhao e colaboradores também utilizaram lipossomas via intranasal para administração do fator de crescimento de fibroblastos (bFGF), uma substância com potencial ação neuroprotetora em pacientes com AVE, e mostrou melhora na recuperação da isquemia (Y.-Z. Zhao et al., 2016).

#### 2.3.2.5 *Lipossomas e AVE*

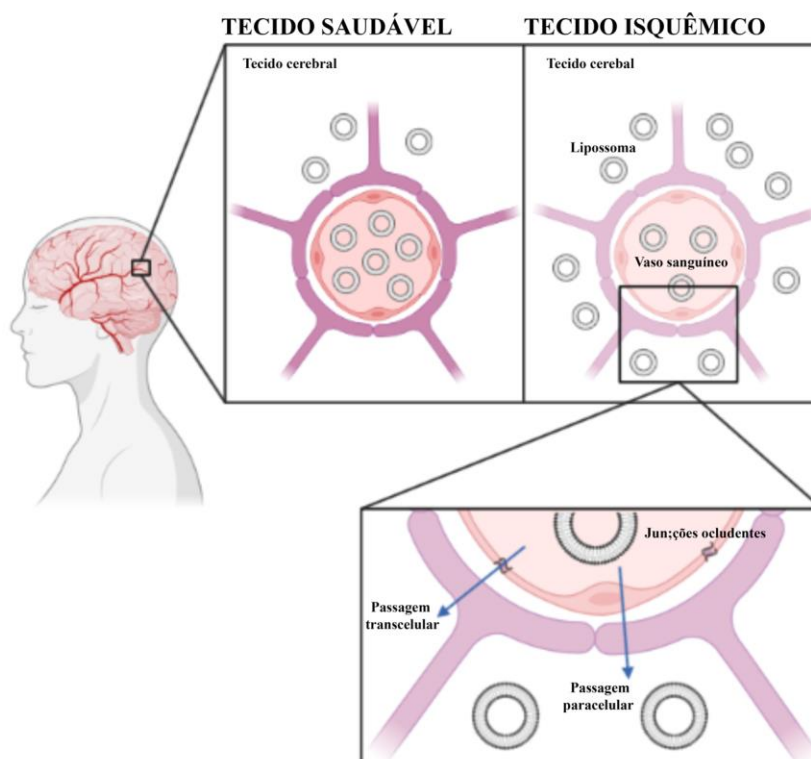
Já é bastante descrito que durante as doenças do SNC ocorrem alterações na BHE. Essas mudanças podem ser o resultado de fatores extrínsecos como no caso da esclerose múltipla (Lassmann et al., 2001), ou de fatores intrínsecos como no caso

da isquemia cerebral (Huang et al., 2006; Moustafa & Baron, 2007). Em ambos os casos, ocorrem danos às junções aderentes, o que leva ao aumento da permeabilidade da BHE (Knowland et al., 2014).

Essa alteração das junções aderentes está também relacionada à ausência de caveolina-1 (S. Wang & Head, 2019). A caveolina-1 é uma proteína de membrana presente nas células endoteliais dos capilares cerebrais. A isquemia pode levar a uma redução dessa proteína afetando as junções aderentes, aumentando a expressão de metaloproteinases (MMPs) (Gu et al., 2012) e prejudicando o suporte proporcionado pelos astrócitos, o que irá influenciar na permeabilidade da BHE (Horng et al., 2017; M. S. Thomsen et al., 2017). Outros estudos também vêm demonstrando que a ocorrência de degeneração do endotélio com o aumento de vesículas transcelulares (responsáveis pelo transporte de moléculas através da BHE) também está relacionado às mudanças na permeabilidade da BHE (Krueger et al., 2013; Ronaldson & Davis, 2012).

O dano causado pela isquemia na BHE tem um caráter bifásico com dois picos de aumento da permeabilidade e consequente aumento da entrada de compostos no tecido cerebral (Knowland et al., 2014). Essa alteração característica após evento isquêmico pode ser positivamente explorada uma vez que agentes terapêuticos também serão capazes de ultrapassar a BHE e alcançar a região cerebral desejada (figura 8). Fukuta e colaboradores mostraram que lipossomas PEGuilados encapsulando fasudil (um inibidor da enzima rho-quinase aprovado para o tratamento de vasoespasmos) foram capazes de se concentrar na região isquêmica, devido a alteração da BHE, aumentando a eficácia do fármaco quando comparado à sua forma livre (Fukuta et al., 2016).

**Figura 8:** Imagem representativa da ação da isquemia na BHE aumentando a passagem dos lipossomas. Após ocorrência do evento isquêmico o tecido cerebral e as células endoteliais da BHE passam por alterações que levam ao aumento da permeabilidade da BHE facilitando a passagem transcelular a paracelular e acúmulo de lipossomas no tecido cerebral. Imagem adaptada de Fernandes et al., 2018.



No entanto, anos antes do trabalho de Fukuta, outros pesquisadores já vinham utilizando lipossomas para a entrega de fármacos no cérebro após a isquemia. O primeiro trabalho que explorou o uso dessas vesículas foi o de Imaizumi em 1990, que utilizou lipossomas com a enzima superóxido dismutase (SOD). Essa enzima catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, reduzindo o número de radicais livres presentes e, conseqüentemente, o estresse oxidativo após isquemia. O trabalho de Imaizumi e colaboradores mostrou que os lipossomas facilitaram a entrega de SOD não só na região isquêmica, mas em outras áreas do cérebro reduzindo o volume de infarto (Imaizumi et al., 1990). Contudo, nesse trabalho ainda foram utilizados lipossomas convencionais e com o avanço nos estudos dos lipossomas PEGuilados esse tipo de formulação ganhou espaço e vem sendo amplamente utilizada para o tratamento pré-clínico do AVE.

No trabalho de Kim e colaboradores, lipossomas PEGuilados permitiram o aumento no tempo de circulação do t-PA (Kim et al., 2009). Fukuta e colaboradores combinaram t-PA e fasudil lipossomal e avaliaram se eles conseguiriam aumentar os benefícios do tratamento com t-PA nesse novo esquema terapêutico melhorando o problema da estreita janela terapêutica do t-PA. Os resultados mostraram que a terapia dupla aumentou os efeitos neuroprotetores quando comparado com a administração do t-PA ou fasudil sozinhos, além de também aumentar a janela terapêutica do t-PA (Fukuta et al., 2017). Saxena e colaboradores utilizaram, além do PEG, uma estratégia termossensível em lipossomas para entrega de agentes trombolíticos. Seus resultados mostraram que lipossomas termossensíveis usados juntamente com hipertermia local foram capazes de promover a trombólise no local desejado reduzindo efeitos adversos sistêmicos (Saxena et al., 2015).

Estudos vêm demonstrando o acúmulo de lipossomas PEGuilados na região isquêmica em fases iniciais após a reperfusão e também a sua retenção na lesão por algumas horas após a sua administração (Fukuta et al., 2015, 2016; Ishii et al., 2013). Esse acúmulo de lipossomas no cérebro após a isquemia foi potencializado com o uso de lipossomas aniônicos e neutros como demonstrado por Campos-Martorell e colaboradores (Campos-Martorell et al., 2016), contrariando estudos anteriores onde lipossomas catiônicos seriam mais eficientes em alcançar o tecido cerebral devido a interação de sua carga positiva com as cargas negativas das proteínas de membrana da BHE.

O grupo do professor Kostarelos foi o primeiro a demonstrar que o acúmulo de lipossomas PEGuilados ocorre em duas janelas temporais diferentes após a isquemia. O estudo mostrou que esses lipossomas foram capazes de acumular no cérebro em uma fase inicial após a reperfusão (0,5h) e numa fase mais tardia (48h). Os autores também mostraram que a entrada dos lipossomas pela BHE na fase inicial ocorreu através de transporte transcelular e que a entrada na fase tardia teve influência do transporte transcelular e também do paracelular (Al-Ahmady et al., 2019).

Vários estudos vêm utilizando estratégias de alteração na superfície dos lipossomas e têm obtido resultados favoráveis. Dentre esses lipossomas podemos citar a utilização de ligantes como HAIYPRH (T7), um peptídeo que tem como alvo o receptor de transferrina (Z. Wang et al., 2015), a própria transferrina (H. Zhao et al.,

2011) e lipossomas funcionalizados com RGD (ácido arginilglicilaspártico) cíclico (N. Zhang et al., 2018). Ishii e colaboradores utilizaram asialo-eritropoetina (AEPO) como uma ferramenta para atingir a região isquêmica por meio da interação dos lipossomas com o receptor de eritropoetina em células neuronais. O estudo mostrou que os lipossomas foram capazes de se ligar às células neurais e também de causar um efeito neuroprotetor no dano isquêmico. Por fim, os autores também demonstraram que após uma única dose de baixa concentração dos lipossomas foi observado melhora cognitiva em animais isquemiados 7 dias após a isquemia (Ishii et al., 2012).

Estratégias mais recentes, como o duplo acoplamento de ligantes à superfície dos lipossomas, também vêm sendo utilizadas no contexto da isquemia. Zhao e colaboradores desenvolveram uma formulação neuroprotetora acoplada ao peptídeo T7 (ligante do receptor de transferrina) e ao stroke homing peptide (SHp – peptídeo expresso preferencialmente na região isquêmica) com o intuito de aumentar a passagem pela BHE e a especificidade pela região isquêmica, respectivamente (Y. Zhao et al., 2016).

A utilização da via intranasal para tratamento do AVC também vem sendo amplamente explorada e no trabalho de Chung e colaboradores, lipossomas contendo C-ficocianina (um agente neuroprotetor) foram acoplados a moléculas de quitosana que devido a suas cargas positivas é capaz de interagir com as cargas negativas de resíduos ácido siálico presente no muco e assim interagir com o muco da cavidade nasal. O uso desses lipossomas aumentou a janela terapêutica de tratamento da C-ficocianina para até 6h após o evento isquêmico (Chung et al., 2018). Esse aumento da janela terapêutica também é bastante importante no caso do AVE, uma vez que muitos pacientes não conseguem receber o tratamento a tempo.

Em um trabalho de Ahmad e colaboradores, nanolipossomas de aproximadamente 40 nm de diâmetro foram utilizados para o tratamento do AVE. Nesse trabalho, os autores testaram se os nanolipossomas seriam capazes de reduzir o volume de infarto em camundongos após sofrerem evento isquêmico. Os resultados mostraram que os nanolipossomas foram capazes de reduzir o volume de infarto e o dano neurológico de animais quando comparados com o grupo controle (Ahmad et al., 2021).

Portanto diante de todos os benefícios do uso dos lipossomas e dos resultados positivos com a Angiotensina-(1-7) no tratamento do AVE, esse trabalho utilizou a Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas para tratamento do AVE.

### **3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

#### **3.1 Justificativa**

O AVE é uma das maiores causas de morte e incapacidade no mundo todo e até o momento não existem terapias neuroprotetoras que consigam reduzir o dano isquêmico e conseqüentemente as sequelas causadas por ele nos pacientes. Em estudos pré-clínicos, a Ang-(1-7) vem demonstrando potencial neuroprotetor no tecido cerebral após a isquemia, contudo esse peptídeo é rapidamente degradado, uma vez administrado ao organismo, e por isso, estratégias que consigam aumentar o tempo de circulação dessa substância ativa são de grande interesse. Nesse contexto, o uso de lipossomas tem se destacado, uma vez que esse sistema é biodegradável e biocompatível, além de proteger as substâncias ativas por ele encapsuladas, reduzindo sua degradação. Os lipossomas também são capazes de se concentrar na região isquêmica, o que também leva ao aumento do fármaco na região de interesse com possível redução da dose.

Todos esses benefícios do tratamento com a Ang-(1-7) e do uso de lipossomas no AVE culminaram no desenvolvimento deste trabalho cujo intuito foi utilizar esse sistema nanocarreador para entrega de Ang-(1-7) no tecido cerebral para o tratamento do AVE.

#### **3.2 Objetivos**

##### *3.2.1 Objetivo Geral*

Avaliar a eficácia do tratamento da isquemia cerebral *in vivo* usando lipossomas carregados com Ang-(1-7), bem como a ação da angiotensina-(1-7) no ambiente isquêmico cerebral.

##### *3.2.2 Objetivos Específicos*

- Preparar e realizar a caracterização dos lipossomas contendo Ang-(1-7);
- Comparar os volumes de infarto dos animais isquemiados tratados com lipossomas incorporando Ang-(1-7) ou com Ang-(1-7) livre;

- Comparar os escores neurológicos dos animais isquemiados tratados com lipossomas incorporando Ang-(1-7) ou com Ang-(1-7) livre;
- Avaliar o desempenho do tratamento com lipossomas incorporando Ang-(1-7) em duas janelas terapêuticas diferentes;
- Avaliar os efeitos da angiotensina-(1-7) sobre o estresse oxidativo e a inflamação 7 dias após a isquemia;
- Avaliar a interação dos lipossomas com as células do tecido cerebral após a isquemia.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparo e caracterização das formulações de lipossomas

#### 4.1.1 Preparo dos lipossomas vazios

Para o preparo dos lipossomas foram utilizados os lipídeos diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), colesterol (COL) e diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG 2000) na proporção molar de 10:5:1, respectivamente e foi incorporada a sonda fluorescente lipofílica derivada da carbocianina, Dil (1,1 dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indo carbocianina perclorato, Molecular Probe, USA), na concentração de 2,5mol% de DSPC para os lipossomas usados nos experimentos de imunofluorescência (Fukuta et al., 2016). A concentração final de lipídios para os lipossomas vazios foi de 90 mM. Para tal preparo, utilizamos o método de congelamento-descongelamento (L. D. Mayer et al., 1985), seguido do processo de extrusão para a calibração do tamanho dos lipossomas (Nayar et al., 1989). Sucintamente, os lipídeos citados acima foram solubilizados em clorofórmio em um balão de fundo redondo que posteriormente foi levado ao rotavapor (banho a 60°C) para evaporação do solvente e formação do filme lipídico. Este então foi hidratado com solução de PBS (NaCl 0,15M, fosfato 0,01 M, pH 7,4) por 1 hora a 60°C e passou, logo em seguida, por 5 ciclos de congelamento-descongelamento. No processo de extrusão, a suspensão de vesículas multilamelares foi submetida à filtração repetida a 65°C através de membrana de policarbonato com poro de 200 nm (5 vezes) seguida de nova extrusão pela membrana de 100 nm (5 vezes), usando uma extrusora.

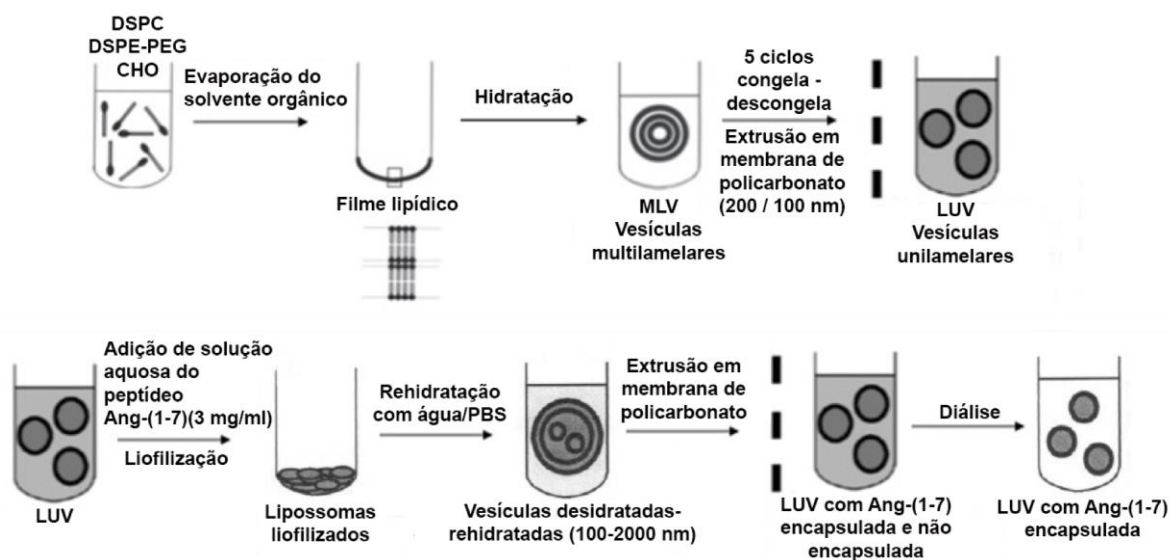


#### 4.1.2 Preparo dos lipossomas incorporando Ang-(1-7)

Também foram preparados lipossomas marcados com a sonda fluorescente Dil, ou sem marcação e que continham em seu interior Ang-(1-7) usando o método de desidratação rehidratação (Kirby & Gregoriadis, 1984; Silva-Barcellos et al., 2001). Os lipossomas passaram pelas mesmas etapas iniciais de preparo citadas acima e ao final da extrusão, a suspensão de lipossomas (1 mL) foi misturada com solução de Ang-(1-7) (1 mL contendo 3mg/mL em NaCl 0,03M) e a mistura foi liofilizada. A amostra liofilizada foi então ressuspensa em 0,2mL de água Mili-Q e incubada por 30 min à 55°C com agitação constante, em seguida foram adicionados 0,2mL de PBS e novamente a dispersão foi incubada por 30 min à 55°C. Posteriormente, a amostra foi diluída com mais 1,4 mL de PBS e extrusada em membrana de 100 nm. A Ang-(1-7) não encapsulada foi retirada através de diálise em PBS à 4°C por 24h, com agitação constante. Para os lipossomas com Ang-(1-7) a concentração final de lipídeos foi de 50 mM.

A figura 9 exemplifica todo o processo de produção dos lipossomas vazios (primeira linha) e dos lipossomas encapsulados com Ang-(1-7).

**Figura 9:** Imagem esquemática resumindo a produção de lipossomas vazios e com Ang-(1-7). Na primeira linha é possível observar a síntese de lipossomas vazios e na segunda linha a continuação da síntese com adição de Ang-(1-7) que é incorporada aos lipossomas.



#### 4.1.3 Caracterização dos lipossomas

O diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas, o índice de polidispersão (PDI), e o potencial Zeta (carga) dos lipossomas, tanto vazios, quanto com Ang-(1-7) encapsulada, foram determinados usando o equipamento Zetasizer (Nano – ZS90, Malvern).

Para realização dessas medidas, em cubeta apropriada, 20 µL da dispersão de lipossomas [vazio ou com Ang-(1-7)] foram diluídos em 2 mL de solução de PBS. A solução diluída foi levada ao equipamento, onde as leituras foram obtidas a 25°C.

Para determinar a taxa de encapsulação da Ang-(1-7) nos lipossomas, foi utilizado o método de quantificação desenvolvido por Silva-Barcellos e colaboradores (Silva-Barcellos et al., 2001), que explora a fluorescência intrínseca do peptídeo. Em espectrofluorímetro (Cary Eclipse, Varian), foi registrada a intensidade de fluorescência (excitação em 280 nm; emissão em 305 nm) do peptídeo em 2mL de metanol acrescentado 50 µL de “lipossomas brancos” [sem Ang-(1-7)]. Foi construída uma curva de calibração variando a concentração do peptídeo de 0,024 a 0,0309 mg/mL, na qual verificou-se a linearidade da relação da fluorescência com a concentração. Em seguida, foi feita leitura da dispersão de lipossomas com Ang-(1-7) antes da diálise (100%) e depois da diálise. Os lipossomas utilizados para esse experimento não estavam marcados com o Dil, uma vez que o objetivo era detectar a fluorescência intrínseca da Ang-(1-7) e a fluorescência do marcador iria interferir nessa quantificação. Utilizando os valores obtidos foi possível determinar as concentrações de Ang-(1-7) em cada situação e assim obter a taxa de encapsulação (TE), que foi calculada da seguinte forma:

$$\%TE = \frac{\text{Concentração de Ang-(1-7) nos lipossomas}}{\text{Concentração Total de Ang-(1-7)}} \times 100$$

Sendo: TE a taxa de encapsulação, Concentração de Ang-(1-7) nos lipossomas o valor obtido com a amostra após a diálise, e Concentração total o valor obtido com a amostra antes da diálise.

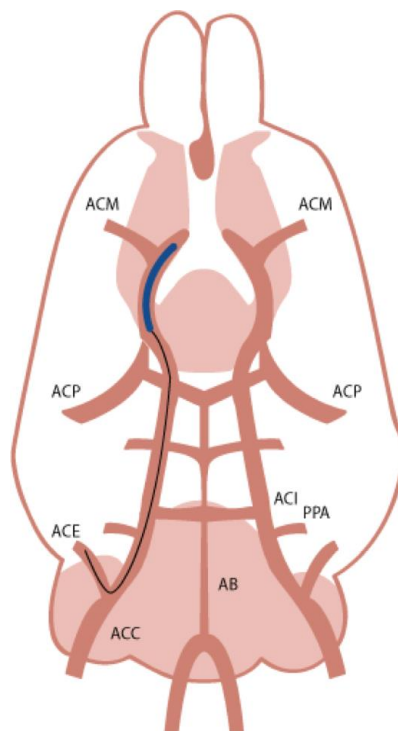
## 4.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem CD1, com 8-12 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água *ad libitum* e tiveram temperatura ambiente controlada (25°C), com fotoperíodo de 12h claro/escuro. Todos os experimentos foram conduzidos de forma a evitar o sofrimento dos animais e a reduzir o número de animais utilizados. Os protocolos experimentais foram aprovados pelos certificados CEUA-UFMG nº 327/2015 e nº 346/2019.

## 4.3 Cirurgia de oclusão da artéria cerebral média (MCAO)

O procedimento cirúrgico utilizado para a indução da isquemia foi baseado na modificação do método descrito por Longa e colaboradores para a oclusão transitória da artéria cerebral média (ACM) (Longa et al., 1989). A anestesia foi induzida pela inalação de 4% Isoflurano (em O<sub>2</sub>) e mantida pela inalação de 1.5 - 2% de Isoflurano. Para realização da cirurgia, o animal foi colocado na posição supina na mesa cirúrgica, suas patas anteriores foram imobilizadas, os pelos da região anterior do pescoço foram retirados e em seguida foi realizada a assepsia dessa região com álcool 70 e álcool iodado. Foi realizada uma pequena incisão sagital mediana na pele e os tecidos foram divulsionados até que a artéria carótida comum (ACC) direita, assim como, a bifurcação em artéria carótida externa (ACE) e artéria carótida interna (ACI) pudessem ser visualizadas. A ACC foi ocluída com um microclipe e a ACE foi ligada com um fio de seda em sua porção distal da bifurcação com a ACI. Em seguida, a ACE foi eletrocauterizada na sua porção distal e um novo fio de seda foi utilizado para realização de um segundo nó na ACE. Posteriormente, o ramo da artéria carótida interna (ACI), pterigopalatino, e a ACI foram temporariamente ocluídos com um microclipe cirúrgico. A ACE foi parcialmente seccionada e o fio de oclusão (MCAo suture 602356PK10/602256PK10, Doccol Corporation, USA) introduzido em direção a ACI até o local em que se encontrava o microclipe. Esse microclipe foi então rapidamente retirado e o fio de oclusão continuou a ser introduzido através da ACI até a origem da artéria cerebral média (ACM) direita, ocluindo assim, a irrigação sanguínea do território correspondente pelo período estabelecido. A figura 10 ilustra o caminho do fio de oclusão até a origem da artéria cerebral média.

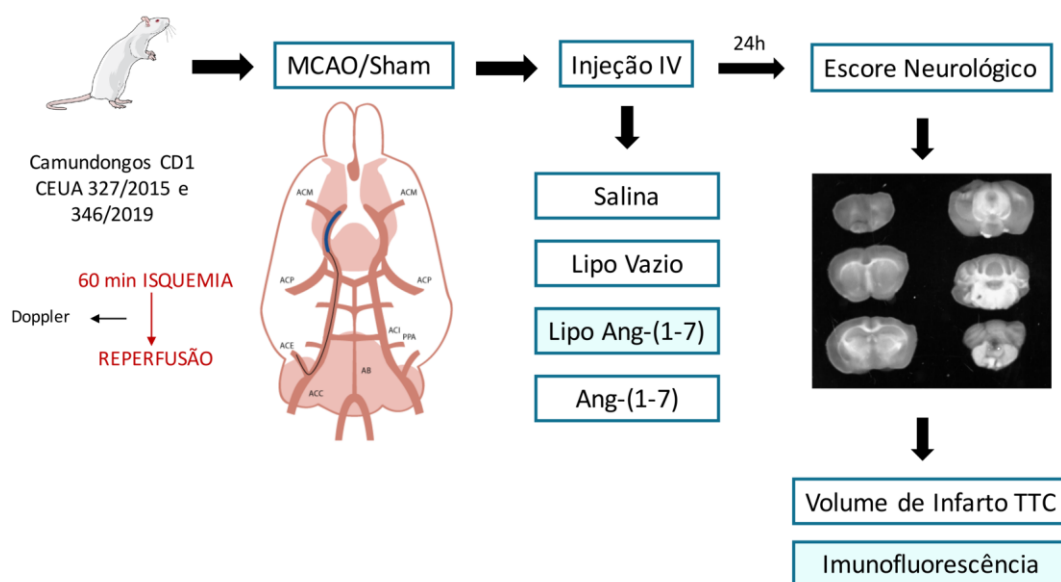
**Figura 10:** Imagem esquemática dos vasos da região inferior do cérebro exemplificando o caminho percorrido pelo fio de oclusão durante a cirurgia de MCAO. O fio de oclusão é introduzido pela ACE, avançando pela ACI até a chegada a ACM onde fica alojado por 1 hora estabelecendo o período de isquemia.



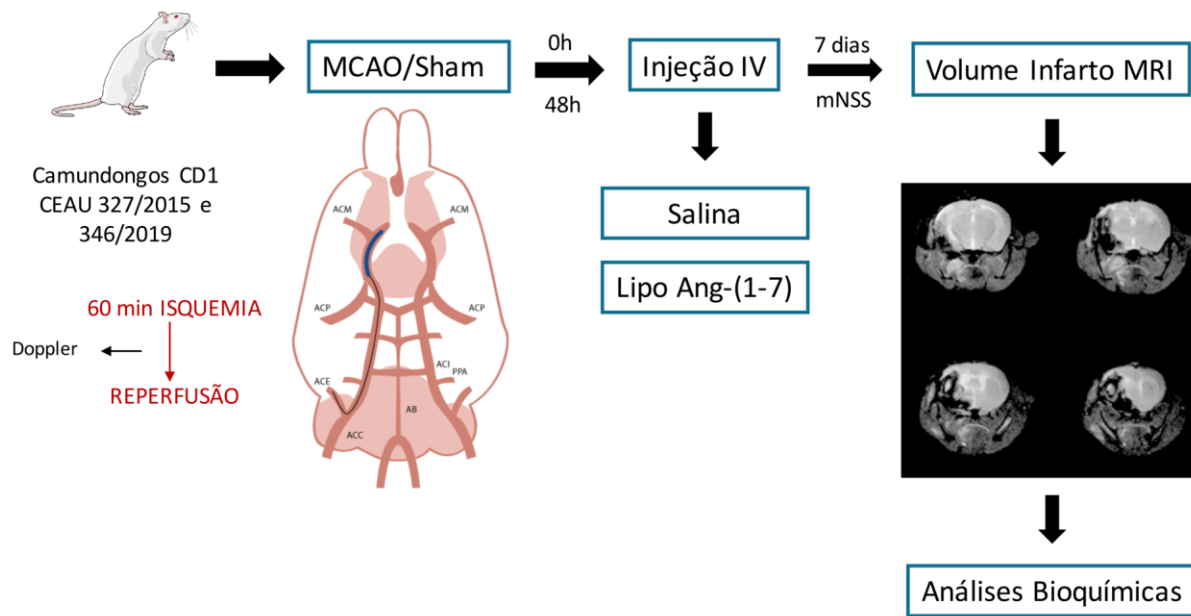
Foram utilizados dois critérios para determinar se o fio de oclusão estava na origem da ACM: a inserção do fio a uma distância de 10 - 11mm da bifurcação da ACC e/ou quando ocorria uma discreta resistência à passagem do fio nessa distância. O fio de oclusão foi mantido nesta posição por meio de uma ligadura à parede da ACE. O animal foi suturado, retirado do aparato anestésico e levado para um aparelho de Laser Doppler (moorLDI2-HIR, moor Instruments) com a finalidade de se verificar a redução do fluxo sanguíneo e estabelecimento da isquemia. Só foram utilizados animais que apresentavam mais de 70% de redução do fluxo sanguíneo. Em seguida, eles foram encaminhados para uma gaiola de recuperação. Durante o período da isquemia, os animais foram mantidos acordados, aquecidos e hidratados com 1 mL de salina intraperitonealmente. Após os 60 minutos de isquemia, os animais foram reanestesiados e o fio de oclusão retirado, dando início a reperfusão. Imediatamente após a sutura dos animais (agudo) ou 48 horas após a cirurgia (crônico), solução salina, lipossoma vazio ou lipossoma com Ang-(1-7) (223 µg/kg) e Ang-(1-7) livre) 223 µg/kg) foram injetados na veia da cauda dos animais.

Animais sham passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, no entanto, sem a efetiva oclusão da artéria. Esses animais também receberam salina, lipossoma vazio ou lipossoma com Ang-(1-7) ou Ang-(1-7) livre via intravenosa. O delineamento experimental dos grupos será exemplificado nas figuras 11 e 12.

**Figura 11:** Delineamento experimental dos grupos que passaram pela cirurgia de MCAO e foram acompanhados 24 horas após a cirurgia (agudo). Camundongos foram submetidos a cirurgia de isquemia recebendo diferentes tratamentos via IV imediatamente após o término da cirurgia. Esses animais foram avaliados através de escore neurológico e volume de infarto e a interação dos lipossomas com células cerebrais foi avaliada pela técnica de imunofluorescência.



**Figura 12:** Delineamento experimental dos grupos que passaram pela cirurgia de MCAO e foram acompanhados 7 dias após a cirurgia (crônico). Após a indução da cirurgia de MCAO os animais receberam diferentes tratamentos via IV imediatamente ou 48 hs após a cirurgia. Esses animais foram acompanhados por 7 dias quando foram submetidos a ressonância magnética para avaliação do volume de infarto e o tecido cerebral foi removido para análises bioquímicas (estresse oxidativo e citocinas inflamatórias).



#### 4.4 Cuidados pós-operatórios

Após a cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos em uma mesa de recuperação por cerca de duas horas para a manutenção da temperatura corporal entre 36-38°C e receberam mais 1 mL de salina e o analgésico Tramadol (5 mg/Kg). Doze horas após a cirurgia, os animais foram pesados e receberam novamente solução salina e Tramadol. Também foram monitorados quaisquer efeitos adversos. Água e ração umedecida foram disponibilizadas no fundo da gaiola para facilitar o acesso. O fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente por até 24 horas após o fim da cirurgia. Parte do grupo de camundongos que passaram pelo protocolo agudo receberam tratamento imediatamente após a cirurgia e foram eutanasiados 24h após a cirurgia para coleta dos cérebros, que foram então levados para realização da coloração com TTC. A outra parte foi submetida a perfusão na qual 10 mL de salina e 10 mL de PFA 2% foram injetados via intracardíaca. Posteriormente os cérebros foram retirados e deixados em PFA 2% por 24h e depois em sacarose 30%. Por fim, os cérebros foram fatiados em criostato para realização de imunofluorescência. O

grupo de camundongos que passou pelo protocolo crônico recebeu tratamento imediatamente ou 48h após a cirurgia e foi mantido por uma semana na qual o peso corporal dos animais foi monitorado e eles foram tratados com tramadol até o terceiro dia e alimentados diariamente. No sétimo dia, os animais foram levados para aquisição das imagens por ressonância magnética e foram sacrificados para coleta dos cérebros para análises bioquímicas.

#### **4.5 Coloração com TTC**

O marcador Trifeniltetrazolium-2.3.5 Cloreto (TTC) foi utilizado neste trabalho para avaliação da lesão após isquemia. Essa técnica histológica pode diferenciar macroscopicamente tecidos viáveis de tecidos lesados. A intensidade da marcação é correlacionada com o número e atividade funcional das mitocôndrias, sendo assim a área não corada pelo TTC é considerada área de infarto (Goldlust Eric J. et al., 1996).

Após a decapitação, o cérebro foi removido e seccionado em fatias de 2mm de espessura. Essas fatias foram imersas em uma solução de 2% TTC a 37 °C durante 15 minutos e em seguida fixadas com paraformaldeído 4% para posterior obtenção de imagens. As imagens dos procedimentos histológicos foram obtidas e fotografadas em Microscópio Zeiss (Stemi 2000-C). Essas imagens foram analisadas no programa *ImageJ – Image Processing and Analysis in Java (NIH, Bethesda, Maryland, USA.)*.

#### **4.6 Imagens por ressonância magnética nuclear (iRMN)**

As iRMN foram adquiridas por meio de um scanner de 4.7T (Oxford) utilizando-se o programa de aquisição de imagens Vnmrj versão 2.3A. Para isso, os animais foram anestesiados com isoflurano (4% Isoflurano em O<sub>2</sub> e mantida pela inalação de 1.5 - 2% de Isoflurano) durante todo o procedimento. Foram obtidas imagens de ressonância magnética estrutural de todos os animais sete dias após a cirurgia de oclusão da ACM direita. As imagens foram feitas de todo cérebro sendo cada uma delas de 800 µm. Foram incluídos no estudo aqueles animais que apresentaram lesão cerebral isquêmica, caracterizada por área clara na imagem (cheia de líquidos). As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Jim versão 5.0 (Jim Image Analysis Package, Xinapse Systems Ltd, Northants, UK). Foi quantificado o volume de área marcada com maior intensidade de branco que representa a porção de infiltrado celular/morte celular, característico da região de infarto.

#### 4.7 Escore neurológico

Déficits neurológicos foram avaliados após a cirurgia por meio do uso do Escore neurológico severo modificado (mNSS) (J. Chen et al., 2005; Y. Li et al., 2000). Esse escore permite uma análise mais ampla dos déficits neurológicos apresentando uma escala que permite avaliação motora, sensorial e de reflexos do animal. Nesse escore, quanto maior a pontuação pior o desempenho dos animais, e é esperado que o grupo sham apresente valores bem baixos do escore. Essa avaliação foi feita por observadores que não sabiam os procedimentos pelos quais cada animal havia sido submetido. A avaliação foi realizada 24h e 7 dias após a cirurgia de isquemia, de acordo com o protocolo experimental.

#### 4.8 Testes bioquímicos com Ang-(1-7)

Análises bioquímicas foram realizadas com o objetivo de avaliar se a angiotensina-(1-7) exerce efeitos sobre o estresse oxidativo e o processo inflamatório, 7 dias após a isquemia. Para isso, realizamos a quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de superóxido dismutase (SOD) como forma de análise do estresse oxidativo (Mecca et al., 2011).

O protocolo de TBARS foi feito por meio da realização de curva padrão e reação das amostras com o ácido tiobarbitúrico (Durço et al., 2019). Resumidamente, os cérebros dos animais do grupo crônico foram retirados, pesados e homogeneizados (100 mg tecido/mL) em PBS (0.1mol/L, pH 7.4). Os homogenatos foram então encubados por 45 minutos a 90°C com solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA 0.37%) em solução ácida (15% ácido tricloroacético e 0.25 N ácido clorídrico). As amostras foram centrifugadas 14000 RPM (rotações por minuto) por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante misturado com *n*-butanol e solução saturada de NaCl. A mistura foi levada ao vortex por 30 segundos e depois centrifugada novamente 22000g por 2 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram pipetadas em placas de 96 poços para leitura de absorbância a 535 nm. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford. Os dados foram expressos em nMol/g proteína.

Já o protocolo para detecção de SOD seguiu o método do pirogallol (Marklund & Marklund, 1974). Os cérebros dos animais foram homogeneizados em PBS (0.1mol/L, pH 7.4) e centrifugados a 14000 RPM por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante, tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 8.2) e pirogallol foram



transferidos para uma microplaca e misturados por 5 minutos. As leituras foram feitas a 37°C, 420 nm em leitor de microplacas. Os dados foram expressos em nMol/g proteína.

Realizamos também a quantificação de citocinas pró (IL1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) como método para análise da inflamação local desenvolvida durante a isquemia (Mecca et al., 2011) por meio do protocolo de ELISA (IL1 $\beta$  RAB0275; IL-6 RAB0309; TNF $\alpha$  RAB0477; IL-10 RAB0245, Sigma). Resumidamente, nesse protocolo os cérebros dos animais do grupo crônico foram homogeneizados em PBS e centrifugados 14000 RPM por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi adicionado as placas de 96 poços específicas de cada citocina juntamente com a solução padrão. Em seguida as placas foram incubadas por 2h ou overnight com agitação constante. Após período de incubação, os poços foram lavados com solução de lavagem seguida da adição do anticorpo de detecção e incubação por 1 hora. Em seguida, os poços foram mais uma vez lavados e foi adicionada a solução com estreptavidina com incubação de 45 minutos. Após incubação, os poços foram lavados e foi adicionada a solução com o substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) seguida de incubação por 30 minutos. Por fim, foi adicionada a solução de parada e foi feita leitura da absorbância a 450 nm (todas as soluções utilizadas pertenciam ao kit correspondente de cada citocina). Os dados foram expressos em CONC pg/proteína.

#### **4.9 Imunofluorescência**

Para análise qualitativa da interação dos lipossomas com as células do tecido cerebral (neurônios, glia e astrócitos) nos grupos isquemiados e SHAM, foi realizada a técnica de imunofluorescência pelo método free floating. As amostras foram obtidas de 11 animais, divididos nos grupos MCAO Ang-(1-7) lipo (n=6) e SHAM Ang-(1-7) lipo (n=5). Todos os animais foram submetidos à perfusão intracardíaca, conforme descrito anteriormente, e seus cérebros foram armazenados em solução de sacarose 30% após fixação em PFA 4% por 24h. Cortes coronais da região do cérebro mais afetada pela isquemia (final do córtex pré-frontal, estriado e início hipocampo), com espessura de 40  $\mu$ m, foram obtidos por meio da secção do tecido em criostato (Leica CM 1860). As fatias foram imersas em solução crioprotetora em placas contendo 96 poços, sendo colocadas 6-10 fatias em cada poço, e armazenadas a -20°C.

Foram selecionadas 4-6 fatias de cada animal, sendo algumas dessas fatias somente de córtex e estriado e algumas contendo córtex, estriado e hipocampo. As fatias selecionadas de cada animal (6 do grupo isquemia e 5 do grupo sham) foram distribuídas em placas de 24 poços onde a imunofluorescência foi realizada. Os tecidos foram lavados em PBS-T 2 vezes por 5 minutos. Em seguida, as fatias tiveram seus sítios imunorreativos inespecíficos bloqueados por soro normal de cabra (NGS) (NeuN e GFAP) ou coelho (IBA) diluído a 5% em PBS-T por 1h a temperatura ambiente. As secções cerebrais foram incubadas por 48h a 4°C com o anticorpo primário NeuN (neurônios - 1:800), GFAP (astrócitos - 1:1000) ou IBA (microglia - 1:1000) diluído em PBS-T + NGS ou soro de coelho 5%.

Após incubação, as fatias foram lavadas 3x em PBS e, em seguida, os cortes foram incubados por 1h30 a temperatura ambiente com o anticorpo secundário IgG anti-camundongo (NeuN), anti-coelho (GFAP) ou anti-cabra (IBA) conjugados ao Alexa Fluor 488 (1:1000) diluído em PBS-T + NGS ou soro de coelho 5%. Em seguida, os cortes foram lavados 3x por 5 minutos em PBS.

Finalmente, os cortes foram incubados com o marcador DAPI (1:10000) diluído em PBS por 5 min para evidenciar o núcleo celular. Todas as fatias incluídas neste estudo foram simultaneamente submetidas aos passos citados, evitando possíveis perturbações ao método. As lâminas foram montadas para a análise em microscópio de fluorescência utilizando-se o meio de montagem aquoso não-fluorescente Hydromount (National Diagnostics). Estas foram armazenadas fora do alcance da luz a 4°C.

#### *4.9.1 Obtenção das imagens de imunofluorescência*

Para as análises da imunofluorescência, fotos das regiões do córtex, estriado e hipocampo de ambos os grupos (MCAO Ang-(1-7) lipo e Sham Ang-(1-7) lipo) foram adquiridas na objetiva de 10X no microscópio de fluorescência AXIO IMAGER M2®.

Para obtenção das imagens, os parâmetros de aquisição (tempo de exposição, ganho digital, brilho e contraste) foram definidos e padronizados para obter uma faixa ampla da intensidade do sinal. Tais parâmetros foram estabelecidos utilizando amostras sobressalentes, não interferindo na aquisição do sinal nas amostras experimentais, e mantidos ao longo da aquisição de todas as imagens. As imagens capturadas foram salvas em formato JPEG 16-bit.

#### 4.10 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média±DP ou mediana±IQ. A estatística foi feita utilizando o software GraphPad Prisma (7 GraphPad Software) e SPSS versão 18.0. Considerando a distribuição de normalidade dos grupos experimentais foram realizados testes paramétricos ou não paramétricos. Para as medidas de volume de infarto (agudo), peso dos animais e escore neurológico utilizou-se ANOVA de dois fatores (SHAM vs MCAO e diferentes tratamentos), post hoc Tukey. Para as medidas de escore neurológico não paramétricas foi utilizado o teste de Mann Whitney (MCAO salina vs MCAO Ang-(1-7) lipo). Para as análises bioquímicas e volume de infarto (crônico) foi utilizado ANOVA de uma via (diferentes tratamentos), post hoc Tukey e Bonferroni. Foram considerados significativos valores  $p < 0.05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização dos lipossomas quanto ao tamanho e à taxa de encapsulação

Todos os lipossomas utilizados foram analisados quanto ao seu tamanho, índice de polidispersão (PDI) e carga. A média do tamanho dos lipossomas vazios foi de  $115.7 \pm 6.1$  nm enquanto a dos lipossomas com Ang-(1-7) foi de  $116.5 \pm 11.4$  nm. O PDI dos lipossomas vazios foi de  $0.07 \pm 0.04$  e o dos lipossomas com Ang-(1-7) foi de  $0.06 \pm 0.02$ . E por fim, o potencial Zeta, que indica a carga superficial detectada, nos lipossomas vazios foi de  $-2.1 \pm 1.9$  mV e nos lipossomas com Ang-(1-7) foi de  $-2.6 \pm 1.7$  mV, tabela 3.

**Tabela 3:** Caracterização de lipossomas vazios e lipossomas incorporando Ang-(1-7).

	DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (NM)	ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO	POTENCIAL ZETA (MV)
<b>LIPO VAZIO</b>	$115.7 \pm 6.13$ nm	$0.07 \pm 0.04$	$-2.1 \pm 1.87$ mV
<b>LIPO ANG-(1-7)</b>	$116.5 \pm 11.36$ nm	$0.06 \pm 0.02$	$-2.6 \pm 1.66$ mV

Além disso, determinamos também a concentração da Ang-(1-7) nos lipossomas e a taxa de encapsulação do peptídeo. Obtivemos uma concentração de  $0.078 \pm 0.009$  mg/mL na suspensão, o que corresponde a uma taxa de encapsulação de 7.1% nos lipossomas.

## 5.2 Protocolo agudo nos animais MCAO/Sham

O protocolo agudo, caracterizado pela administração dos diferentes tratamentos imediatamente após a reperfusão, foi um dos esquemas terapêuticos escolhidos para realização deste trabalho. Esse tratamento pode ser dividido em dois grupos. O primeiro grupo foi tratado imediatamente após a cirurgia, avaliado funcionalmente por meio de um escore neurológico e sacrificado 24h após a isquemia para retirada dos cérebros e realização da coloração do TTC (Sham n=5; MCAO salina n=9; MCAO lipo n=10; MCAO Ang-(1-7) lipo n=6; MCAO Ang-(1-7) n=7). O segundo grupo recebeu como tratamento somente Lipo Ang-(1-7) e não passou pela avaliação do escore neurológico, mas 24h após a isquemia ele foi submetido a perfusão intracardiaca com PBS e PFA 2%. Os cérebros foram retirados e fatiados para realização da imunofluorescência.

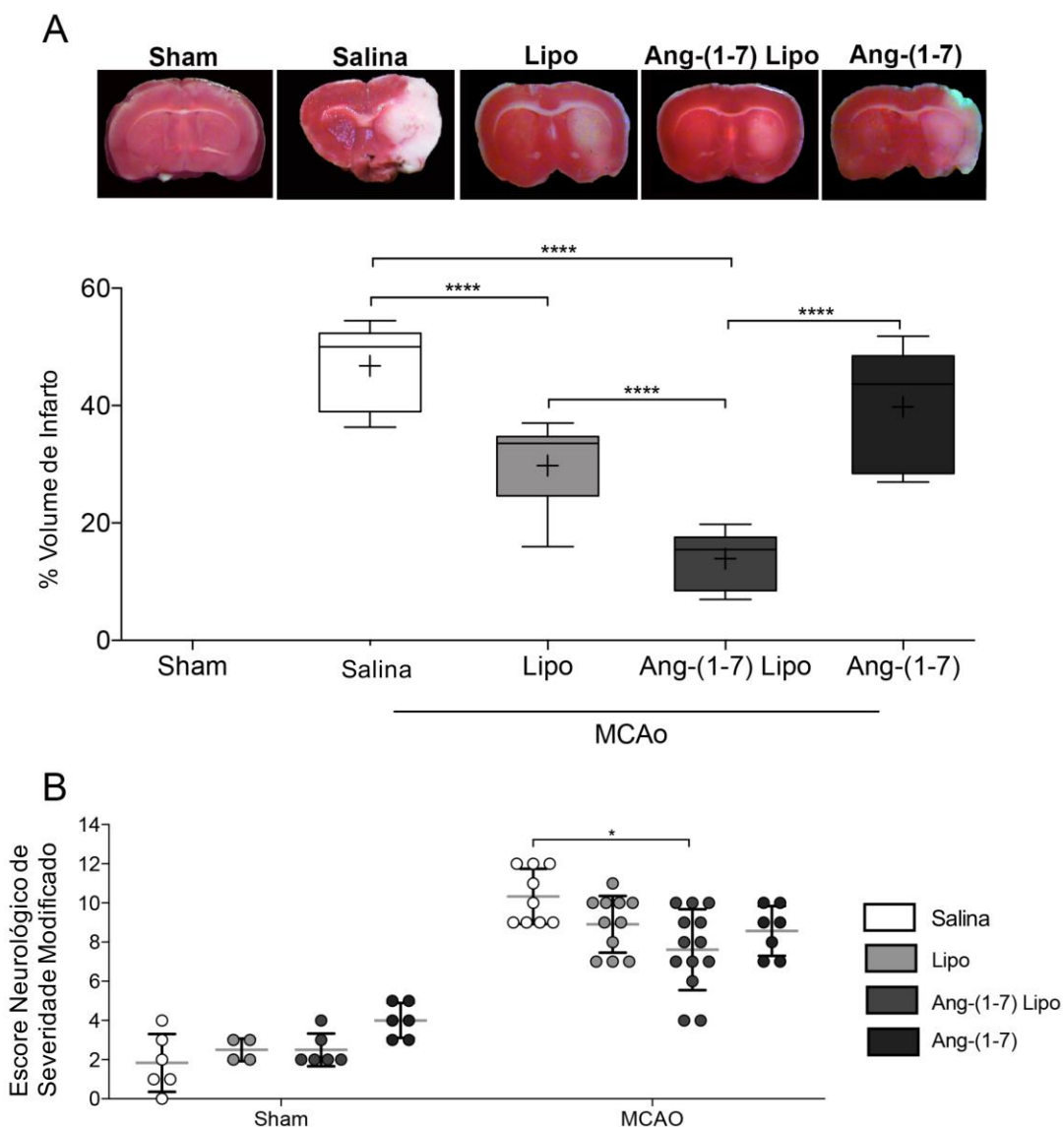
A coloração do TTC indica o volume de infarto sofrido após a isquemia e esse volume foi avaliado para os animais que sofreram isquemia e para o grupo sham. Os animais do grupo sham, como esperado, não tiveram isquemia, portanto apresentando um volume de infarto igual a zero. Entre o grupo dos animais isquemiados o grupo MCAO salina ( $46.79 \pm 6.92$ , n=9) e MCAO Ang-(1-7) ( $39.8 \pm 9.84$ , n=6) livre foram os que apresentaram os maiores volumes de infarto não sendo significativamente diferentes entre eles, como mostrado na figura 13, parte A. Já era esperado o alto volume de infarto do grupo salina uma vez que esse grupo não recebeu nenhum tratamento. Mas o alto valor de volume de infarto do grupo MCAO Ang-(1-7) confirma que esse peptídeo, uma vez injetado livre diretamente na corrente sanguínea, é rapidamente degradado não exercendo seu potencial efeito como agente neuroprotetor.

Quando analisamos os grupos tratados com lipossomas vazios (MCAO Lipo vazio) e lipossomas com Ang-(1-7) (MCAO Ang-(1-7) lipo) obtivemos um volume de infarto significativamente menor para os animais tratados com lipossomas vazios, quando comparados com o grupo salina e com o grupo MCAO Ang-(1-7) livre

(31.33±5.65 vs 46.79±6.92 e 39.8±9.84). Mas apesar do grupo lipossoma vazio já ter apresentado reduzido volume de infarto quando analisamos o grupo MCAO Ang-(1-7) lipo foi possível observar uma redução de mais de 50% no volume de infarto quando comparado com os grupos salina e Ang-(1-7) (13.92±4.98 vs 46.79±6.92 e 39.8±9.84) mostrando a eficácia desse sistema nanocarreador com Ang-(1-7) em proteger o cérebro contra os danos isquêmicos.

Além disso, os animais também foram avaliados quanto ao seu desempenho funcional por meio da realização de um escore neurológico (Sham salina n=6; Sham Lipo n=4; Sham Ang-(1-7) lipo n=6, Sham Ang-(1-7) n=6; MCAO salina n=9; MCAO lipo n=11; MCAO Ang-(1-7) lipo n=13; MCAO Ang-(1-7) n=7). O escore utilizado foi o mNSS para análise do efeito dos tratamentos no desempenho motor e sensorial dos animais. Quando analisamos os resultados do escore, parte B da figura 13, conseguimos perceber que diferente do observado no volume de infarto somente os animais tratados com MCAO Ang-(1-7) lipo (7.61±2.06, n=13) tiveram melhor desempenho, e os grupos tratados com MCAO Lipo vazio (8.90±1.45, n=11) e com MCAO Ang-(1-7) livre (8.57±1.27, n=7) apresentaram escore semelhante aos do grupo controle (10.33±1.41, n=9).

**Figura 13:** Gráfico do volume de infarto e escore neurológico 24h após cirurgia de MCAO e tratamento. A figura mostra tanto o volume de infarto e imagens representativas da coloração de TTC realizada para quantificação desse volume **(A)** nos diferentes grupos de tratamento (Sham n=5; MCAO salina n=9; MCAO lipo n=10; MCAO Ang-(1-7) lipo n=6; MCAO Ang-(1-7) n=7). Também é mostrado o escore neurológico dos animais 24h após a cirurgia **(B)** (Sham salina n=6; Sham Lipo n=4; Sham Ang-(1-7) lipo n=6, Sham Ang-(1-7) n=6; MCAO salina n=9; MCAO lipo n=11; MCAO Ang-(1-7) lipo n=13; MCAO Ang-(1-7) n=7). Os valores são expressos em média±desvio padrão. Two-way anova post hoc Tukey, \*\*\*\*p<0.0001.



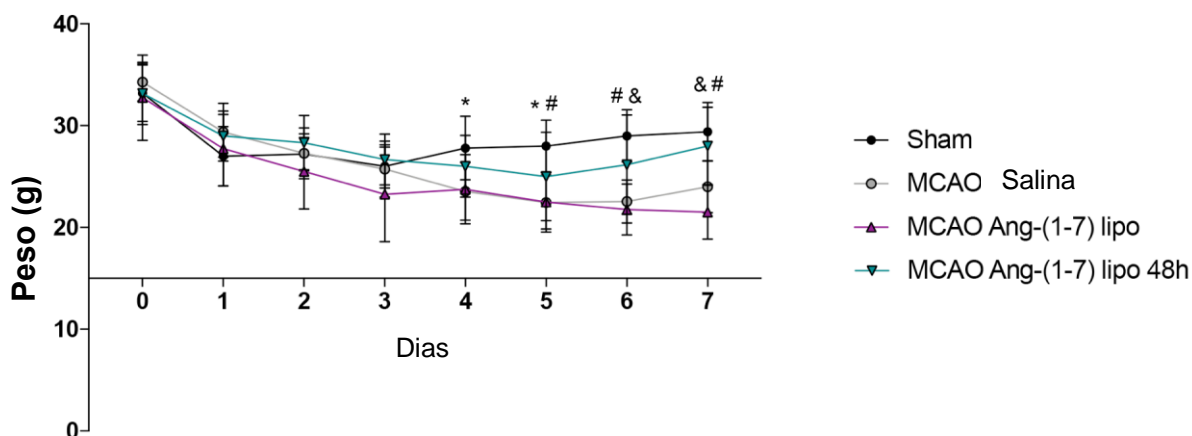
### 5.3 Protocolo crônico dos animais MCAO/Sham

Além do esquema terapêutico imediatamente após a cirurgia também foi realizado o tratamento 48h após a cirurgia, uma vez que poucos pacientes conseguem detectar a ocorrência da isquemia e chegar a tempo em um hospital para

seu tratamento é importante a análise de tratamentos mais tardios. Para esse grupo, portanto, realizamos o tratamento com Ang-(1-7) Lipo imediatamente e 48h após a cirurgia (Sham n=5; MCAO salina n=9; MCAo Ang-(1-7) lipo n=4; MCAO Ang-(1-7) lipo 48h n=6). Além disso, esses animais foram acompanhados por 7 dias durante os quais todos eles foram pesados e tiveram seu desempenho funcional avaliado por meio do escore neurológico, por isso esse protocolo foi chamado de crônico. Ao final dos 7 dias os animais foram levados para um equipamento de ressonância magnética para detecção do volume de infarto e, por fim, os cérebros foram retirados para análises bioquímicas.

O gráfico 14 mostra a análise do peso desses animais ao longo dos dias. E o que podemos ver detalhado neste gráfico é que no dia seguinte à cirurgia (dia 1) todos os grupos apresentam uma queda no peso e que nenhum dos grupos consegue recuperar seu peso inicial de antes da cirurgia (dia 0) após os 7 dias. Mas com o passar dos dias, principalmente a partir do dia 4, o grupo Sham ( $27.8 \pm 3.11$ , n=5) e o grupo MCAO Ang-(1-7) lipo 48h ( $26 \pm 3.03$ , n=6) apresentam aumento de peso significativo, se distinguindo dos grupos MCAO salina ( $23.55 \pm 2.84$ , n=9) e MCAO Ang-(1-7) lipo ( $23.75 \pm 3.4$ , n=4). Apesar de esperado, essa melhora considerável não foi observada no grupo MCAO Ang-(1-7) lipo.

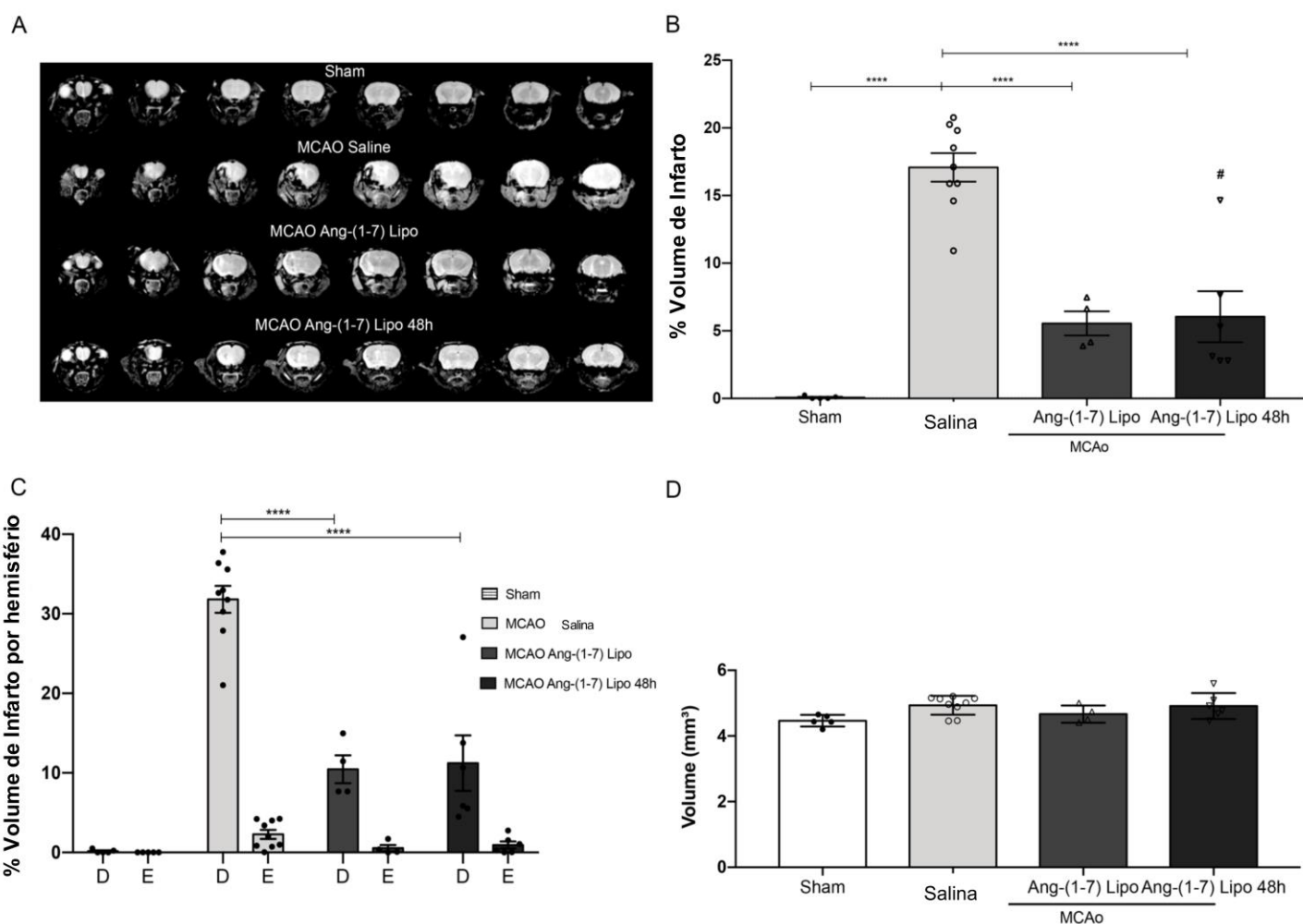
**Figura 14:** Gráfico da média dos pesos de todos os animais de todos os grupos experimentais que foram acompanhados por 7 dias após a cirurgia de MCAO. A figura mostra os pesos dos animais do grupo Sham e dos grupos MCAO que receberam somente salina e os que foram tratados com lipo Ang-(1-7) imediatamente e 48h após a cirurgia ao longo dos 7 dias após a realização do MCAO (Sham n=5; MCAO salina n=9; MCAO Ang-(1-7) lipo n=4; MCAO Ang-(1-7) lipo 48h n=6). Os valores são expressos em média±desvio padrão. Two-way anova post hoc Tukey, \*p<0.05, #p<0.01, &p<0.001 comparado com sham.



A partir da análise do volume de infarto obtido pela iRMN foi possível observar que o grupo tratado com Ang-(1-7) lipo apresentou redução de mais de 50% no volume de infarto ( $5.55 \pm 1.78$ , n=4) quando comparado com o grupo não tratado ( $17.08 \pm 3.16$ , n=9), (figura 15). Isso corrobora com os resultados já encontrados anteriormente neste trabalho. Além disso, como representado no gráfico da figura 15B o grupo que recebeu o tratamento 48h após a cirurgia também teve uma redução significativa do seu volume de infarto ( $6.04 \pm 4.63$ , n=6) quando comparado com o grupo não tratado ( $17.08 \pm 3.16$ , n=9). Isso mostra a eficácia do tratamento em um momento mais tardio.



**Figura 15:** Gráfico do volume de infarto e volume total do cérebro dos animais acompanhados cronicamente. Nos gráficos podemos observar os grupos que passaram pelo MCAO e receberam como tratamento somente salina, os grupos que passaram pelo MCAO e receberam lipossomas com Ang-(1-7) imediatamente após a cirurgia (Ang-(1-7) lipo), e os grupos que receberam lipossomas com Ang-(1-7) 48h após a cirurgia (Ang-(1-7) lipo 48h). A figura mostra as imagens dos volumes de infarto totais obtidas por ressonância magnética **(A)** e sua respectiva quantificação **(B)**. Também podemos observar os volumes de infarto proporcionais de cada hemisfério (direito D e esquerdo E) cerebral **(C)** e o volume total dos cérebros **(D)** utilizados nos experimentos. Sham n=5; MCAO salina n=9; MCAO Ang-(1-7) lipo n=4; MCAO Ang-(1-7) lipo 48h n=6. Os valores são expressos em média±desvio padrão. One-way e two-way anova post hoc Bonferroni, \*\*\*\*p<0.0001, #p<0.05 comparado com sham.

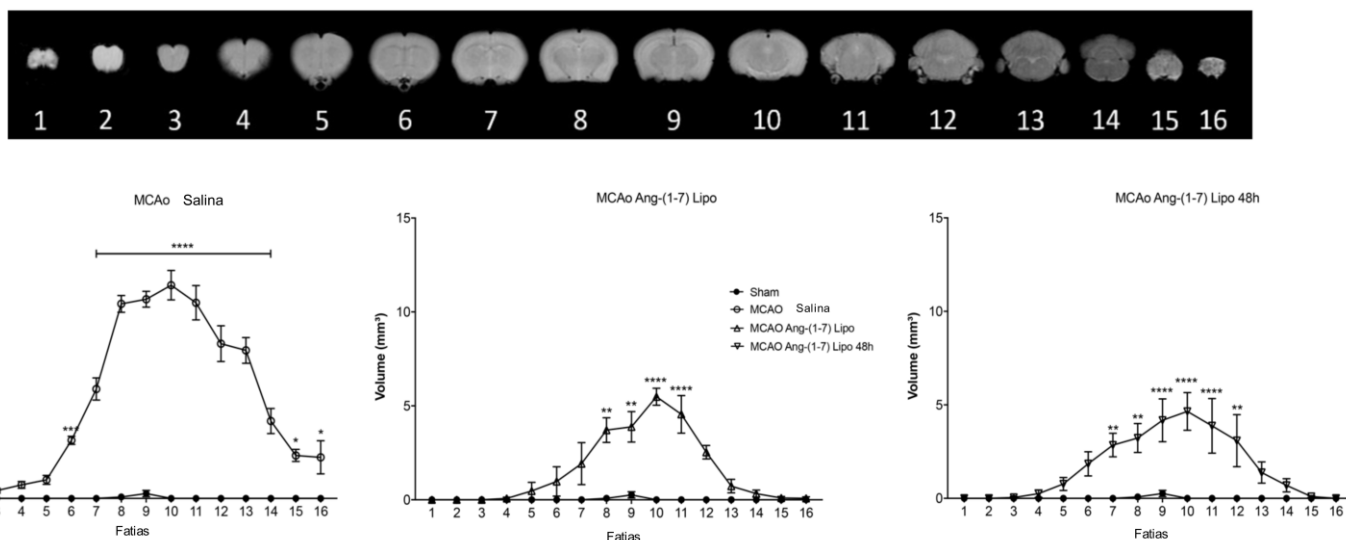


Além da análise do volume de infarto, também foi quantificada a porcentagem do volume de infarto por hemisfério e o volume total cerebral em cada grupo 7 dias após a isquemia. Pela análise por hemisfério, gráfico 15C, é possível observar que o

volume de infarto tanto do grupo Ang-(1-7) lipo ( $10.45 \pm 3.50$ ,  $n=4$ ) quanto do grupo Ang-(1-7) lipo 48h ( $11.23 \pm 8.54$ ,  $n=6$ ) reduziu significativamente quando comparado ao grupo não tratado ( $31.81 \pm 5.09$ ,  $n=9$ ). E a análise do volume total cerebral de todos os grupos mostrou que, 7 dias após a isquemia não há diferença significativa de volume entre os cérebros dos grupos experimentais, figura 15D.

Também foi realizada análise do volume de infarto ao longo das fatias cerebrais dos grupos tratados com Ang-(1-7) lipo e com Ang-(1-7) lipo 48h comparado com o grupo salina. É a primeira vez que é mostrada essa ação da Ang-(1-7) ao longo das fatias e com isso conseguimos perceber que o tratamento com a Ang-(1-7) encapsulada nos lipossomas além de reduzir o volume de infarto em cada fatia como já esperado, também reduziu o dano nas regiões mais rostrais e ventrais como as fatias 6, 7 e 12 a 16, para o Ang-(1-7) lipo e as fatias 6 e 13 a 16 para o Ang-(1-7) lipo 48h que apresentaram menor volume de infarto quando comparado com o grupo salina (figura 16).

**Figura 16:** Gráfico do volume de infarto distribuído ao longo das fatias cerebrais em todos os grupos MCAO. Na figura vemos todas as 16 fatias que foram escaneadas durante a imagem de ressonância magnética e logo abaixo os gráficos com a quantificação dos volumes de infarto correspondentes a cada fatia nos grupos MCAO salina, Ang-(1-7) lipo e Ang-(1-7) lipo 48h. Sham  $n=5$ ; MCAO salina  $n=9$ ; MCAO Ang-(1-7) lipo  $n=4$ ; MCAO Ang-(1-7) lipo 48h  $n=6$ . Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. One-way anova, post hoc Bonferroni,  $**p < 0.01$ ,  $****p < 0.0001$ .



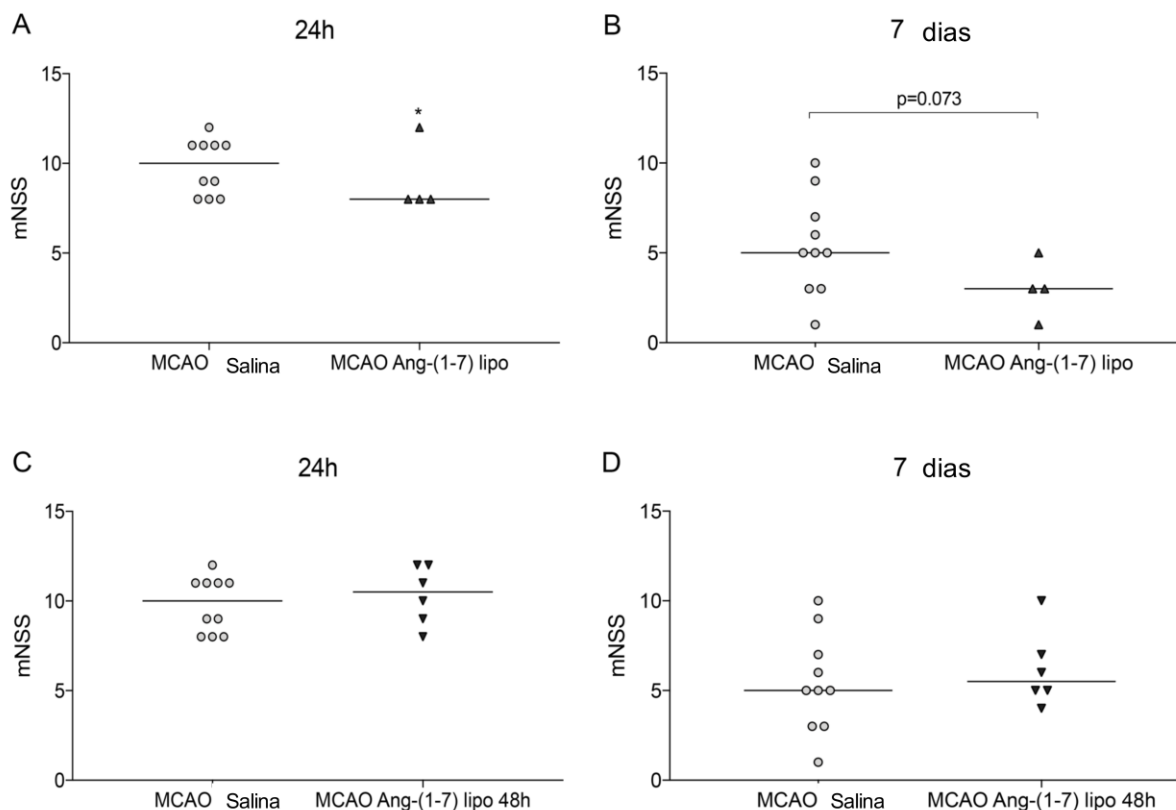
Por fim, esses animais também foram avaliados quanto ao seu desempenho funcional por meio do mesmo escore utilizado nos grupos de acompanhamento

agudo. Esse escore foi realizado imediatamente e 7 dias após a cirurgia. E como pode ser observado na figura 17A o que já havia sido visto na figura 13B foi reproduzido, ou seja, os animais tratados com Ang-(1-7) lipo apresentaram significativamente melhor desempenho (mediana 8, n=4) quando comparado com os animais do grupo MCAO salina (mediana 10, n=10). Quando olhamos para o gráfico 17B que mostra os valores dos escores 7 dias após a cirurgia vemos que há uma melhora tanto do grupo MCAO salina (mediana 5, n=10) quanto do grupo MCAO Ang-(1-7) lipo (mediana 3, n=4), mas também podemos observar que o grupo MCAO Ang-(1-7) lipo teve desempenho melhor que o grupo MCAO salina com valor de p próximo a 0.05, indicando que a melhora funcional vista 24h após a isquemia também pode ser observada após os 7 dias de cirurgia.

Já quando analisamos o grupo MCAO Ang-(1-7) lipo 48h (mediana 10.5 24h; mediana 5.5 7 dias, n=6) não vemos nenhuma diferença quando comparado com o grupo salina nem 24h e nem 7 dias depois. Já era de se esperar não encontrarmos diferença 24h depois uma vez que nesse momento os animais ainda não tinham recebido o tratamento (que foi dado 48h depois da cirurgia) e, portanto, deveriam apresentar valores semelhantes aos do grupo salina. No entanto, o fato de não termos encontrado diferença após 7 dias pode indicar uma redução na eficácia funcional do tratamento tardio.

**Figura 17:** Escore neurológico dos animais acompanhados por 7 dias após a cirurgia de isquemia.

Nos gráficos temos o valor dos escores tanto 24h após a cirurgia como 7 dias após a cirurgia para os grupos MCAO salina, MCAO Ang-(1-7) lipo e MCAO Ang-(1-7) lipo 48h. MCAO salina n=10; MCAO Ang-(1-7) lipo n=4; MCAO Ang-(1-7) lipo 48h n=6. Os valores são expressos em mediana. Mann Whitney, \*p<0.05.



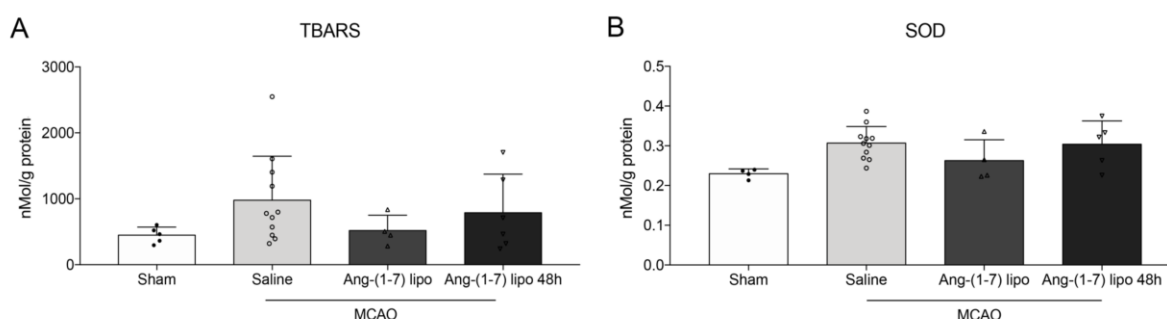
#### 5.4 Análises Bioquímicas

Após a realização das imagens de ressonância magnética os animais foram sacrificados e seus cérebros coletados para a realização das análises de estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias, portanto, essas análises foram realizadas em cérebros de 7 dias após a cirurgia.

Como já vem sendo amplamente descrito na literatura, a cascata de eventos que ocorre durante a isquemia e reperfusão é caracterizada por ampla produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando ao estresse oxidativo, e também por liberação de citocinas inflamatórias gerando um processo de inflamação local (Bruch et al., 2019). Por isso, optamos por realizar a quantificação de malondialdeído (MDA), produto da lipoperoxidação causada por ROS e indicativo de estresse oxidativo, por meio do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). E também da SOD

(superóxido dismutase) enzima que elimina radicais livres sendo também um indicativo de estresse oxidativo. Analisando o gráfico A da figura 18 de TBARS percebemos um aumento na quantidade de proteína para o grupo salina ( $979 \pm 666.8$  n=11) quando comparado com os outros grupos (Sham  $449,4 \pm 12$  n=5; Ang-(1-7) lipo  $519 \pm 231.9$  n=4; Ang-(1-7) lipo 48h:  $787.7 \pm 585.6$  n=6), e também percebemos que o grupo Ang-(1-7) lipo apresentou valor próximo aos do grupo sham, contudo como o desvio padrão também foi alto não foi detectada nenhuma diferença significativa entre os grupos. No gráfico B da mesma figura, percebemos o mesmo padrão do gráfico A, (apesar de ser esperado o oposto) com os valores de proteína para o grupo Sham ( $0.2298 \pm 0.012$ , n=5) e para o grupo Ang-(1-7) lipo ( $0.2625 \pm 0.053$ , n=4) similares e os valores do grupo Salina ( $0.3069 \pm 0.042$ , n=11) e Ang-(1-7) lipo 48h ( $0.3038 \pm 0.059$ , n=6) mais altos. Mas ainda assim não foi possível detectar diferença significativa entre os grupos.

**Figura 18:** Gráfico da análise de estresse oxidativo no hemisfério isquêmico 7 dias após o tratamento. Nos gráficos podemos observar os grupos que passaram pelo MCAO e receberam como tratamento somente salina, os grupos que passaram pelo MCAO e receberam lipossomas com Ang-(1-7) imediatamente após a cirurgia (Ang-(1-7) lipo), e os grupos que receberam lipossomas com Ang-(1-7) 48h após a cirurgia (Ang-(1-7) lipo 48h). Sham n=5; MCAO salina n=11; MCAO Ang-(1-7) lipo n=4; MCAO Ang-(1-7) lipo 48h n=6. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Tanto no gráfico de TBARS quanto no da SOD não houve diferença entre os diferentes tratamentos. One-way anova, *post hoc* Tukey.

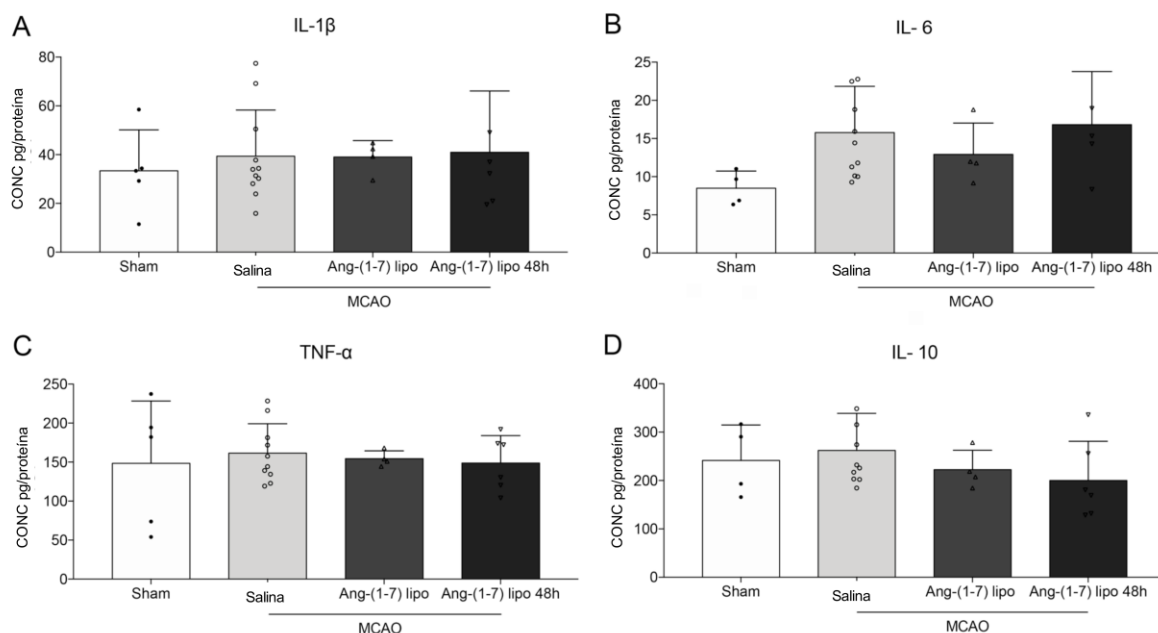


Durante a cascata de dano celular proporcionada pela isquemia e reperfusão, também ocorre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, com esse processo inflamatório tendo início algumas horas após a isquemia e podendo durar semanas. Por isso, optamos também por quantificar algumas citocinas pró-inflamatórias (IL1 $\beta$ ,

IL-6, TNF $\alpha$ ) e uma anti-inflamatória (IL-10). O gráfico A da figura 19 mostra valores de IL1 $\beta$  para todos os grupos muito similares (Sham 33.19 $\pm$ 16.78 n=5; Salina 39.35 $\pm$ 18.94 n=11; Ang-(1-7) lipo 39.01 $\pm$ 6.75 n=4; Ang-(1-7) lipo 48h 40.98 $\pm$ 25.1 n=6) não havendo diferença estatística entre esses valores. O gráfico B da mesma figura mostra um aumento no valor de IL-6 para o grupo Salina (15.78 $\pm$ 6.07, n=11) quando comparado com o grupo Sham (8.49 $\pm$ 2.24, n=6), mas os grupos tratados não apresentaram redução significativa nesses valores (Ang-(1-7) lipo 12.93 $\pm$ 4.11, n=4), sendo que o grupo Ang-(1-7) lipo 48h apresentou pequeno aumento no valor de IL-6 (16.83 $\pm$ 6.95, n=6). Mais uma vez, não foi observada nenhuma diferença entre os níveis dessas citocinas nos grupos tratados com lipossomas contendo Ang-(1-7) quando comparados com os grupos salina e sham. O gráfico C da figura 19 mostra os valores para TNF $\alpha$ . Nesse caso, os valores do grupo Sham (148.4 $\pm$ 80.09, n=5) e Ang-(1-7) lipo 48h (148.8 $\pm$ 35.22, n=6) foram os menores, havendo aumento no grupo Salina (161.5 $\pm$ 37.68, n=11) e no grupo Ang-(1-7) lipo (154.5 $\pm$ 10.08, n=4), mas ainda assim não houve diferença significativa entre os grupos. E por fim, o gráfico D mostra os valores para a citocina anti-inflamatório IL-10 que estavam mais altos nos grupos Sham (241.5 $\pm$ 73.18, n=5) e Salina (262.3 $\pm$ 76.49, n=11) quando comparados com os grupos Ang-(1-7) lipo (222.4 $\pm$ 40.06, n=4) e Ang-(1-7) lipo 48h (200.3 $\pm$ 80.88, n=6). Mais uma vez, no entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre esses grupos.

**Figura 19:** Gráfico da análise de citocinas pró (IL1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) no hemisfério isquêmico 7 dias após o tratamento.

Nos gráficos podemos observar os grupos que passaram pelo MCAO e receberam como tratamento somente salina, os grupos que passaram pelo MCAO e receberam lipossomas com Ang-(1-7) imediatamente após a cirurgia (Ang-(1-7) lipo), e os grupos que receberam lipossomas com Ang-(1-7) 48h após a cirurgia (Ang-(1-7) lipo 48h). Sham n=5; MCAO salina n=11; MCAO Ang-(1-7) lipo n=4; MCAO Ang-(1-7) lipo 48h n=6. Os valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão. Em nenhum dos gráficos houve diferença estatística entre os tratamentos. One-way anova, pos hoc Tukey.



## 5.5 Imunofluorescência

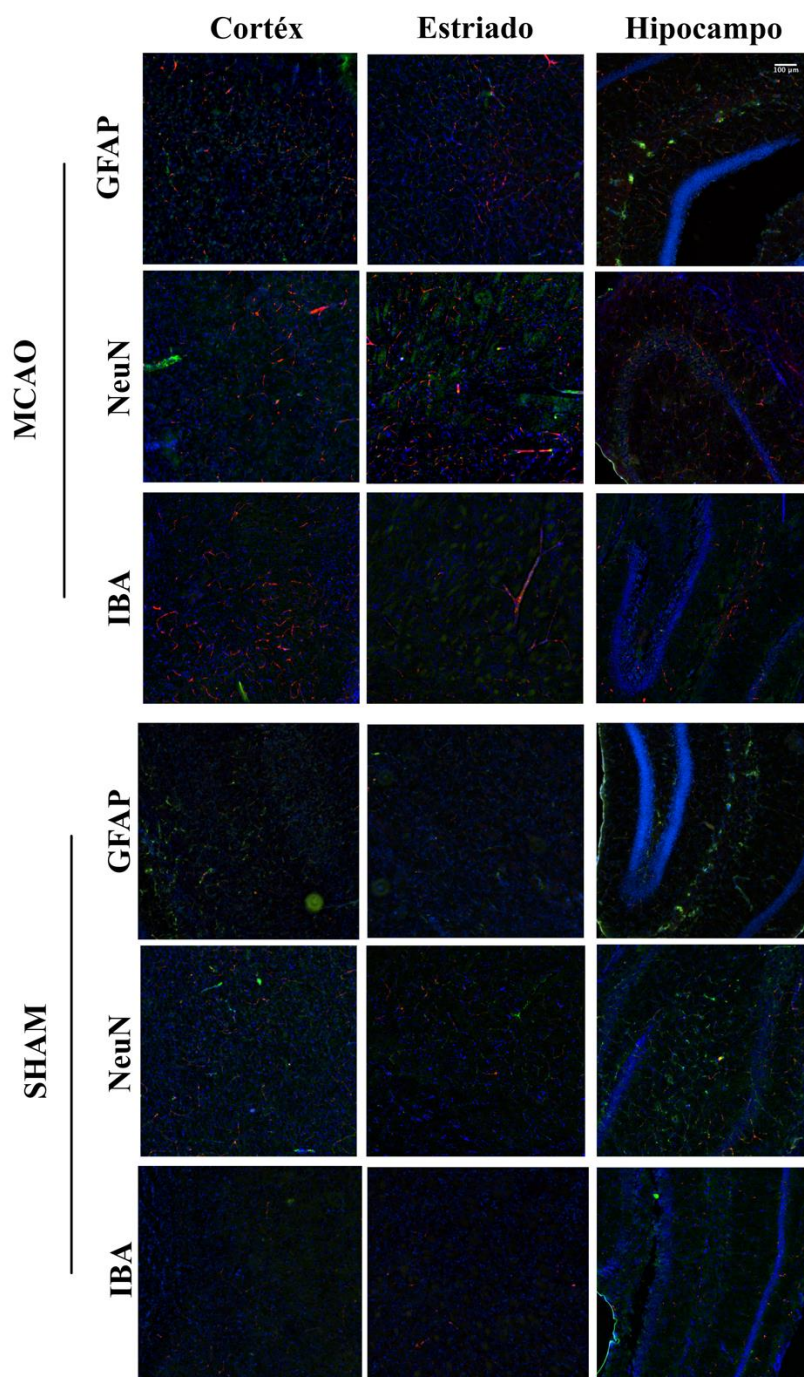
A imunofluorescência foi realizada como forma de análise da interação dos lipossomas com as células cerebrais. Para essa avaliação os animais do grupo que foi submetido ao protocolo agudo foram perfundidos tendo seus cérebros retirados e fatiados em Criostato (Sham Ang-(1-7) lipo n=5; MCAO Ang-(1-7) lipo n=6). Para análise da interação foram escolhidos os neurônios, astrócitos e micróglias como as células cerebrais de interesse e, como áreas cerebrais, o córtex, hipocampo e estriado. Como pode ser observado na figura 20, tanto no grupo isquemiado quanto no grupo sham é possível observar a presença de lipossomas nas três estruturas (córtex, estriado e hipocampo).

A análise qualitativa dessas imagens nos permite concluir que, nos animais isquemiados, a presença dos lipossomas é mais intensa do que no grupo sham. Não

há diferença aparente na quantidade de lipossomas presentes nas estruturas de córtex, estriado e hipocampo. Contudo, ainda assim os animais sham também apresentaram lipossomas nas suas fatias mostrando que a nanopartícula com a substância ativa Ang-(1-7) foi capaz de chegar ao cérebro tanto de animais isquemiados quanto de animais sham.



**Figura 20:** Gráfico da análise qualitativa da imunofluorescência no cérebro de animais que passaram por cirurgia de MCAO/Sham e foram tratados com Ang-(1-7) lipo imediatamente após a cirurgia. As imagens são do córtex, hipocampo e estriado 24h após a cirurgia. Em vermelho vemos a marcação dos lipossomas, em verde as marcações das células cerebrais (astrócitos, neurônios e micróglia) e em azul DAPI. Sham Ang-(1-7) lipo n=5; MCAO Ang-(1-7) lipo n=6.



Um fato que chamou a atenção foi a baixa ou quase nula colocalização entre os lipossomas e as células cerebrais marcadas (neurônios, astrócitos e micróglia).

E o que foi bem característico ao se observar as imagens das fatias tanto do grupo MCAO quanto do grupo Sham é que os lipossomas estão distribuídos de forma a sugerir uma delimitação dos vasos sanguíneos. Isso pode ser um indicativo de que grande parte dos lipossomas interagiu majoritariamente com as células endoteliais dos capilares sanguíneos da BHE. E, por isso, a baixa colocalização com as células do tecido cerebral.

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 Caracterização dos lipossomas quanto ao tamanho e a taxa de encapsulação**

Os lipossomas utilizados nesse trabalho tiveram um diâmetro hidrodinâmico em torno de 116 nm, uma média de PDI de 0.065 e potencial zeta em torno de -2.4 mV (tabela 3). Como já é bem demonstrado na literatura, lipossomas com diâmetro pequeno, em torno de 100 nm, possuem tempo de circulação prolongado no sangue (L. Chen & Gao, 2017; Dinda & Pattnaik, 2013) e elevada capacidade de atravessar a BHE (Fukuta et al., 2016). Como nosso intuito era a passagem pela BHE e chegada a região isquêmica optamos pela síntese de lipossomas de diâmetro em torno de 100 nm. Além disso, também foi feita a síntese de lipossomas PEGuilados que, como discutido anteriormente, possuem maior tempo de circulação quando comparados com os convencionais.

O PDI é um índice que indica a homogeneidade do tamanho dos lipossomas presentes na dispersão analisada e já é bem estabelecido que um valor abaixo de 0,3 indica alta homogeneidade e abaixo de 0,1 uma população única e monodispersa (D. G. Hunter & Frisken, 1998). Como ambas as dispersões (lipo vazio e lipo Ang-(1-7)) apresentaram PDI abaixo de 0,1 (aproximadamente 0.06), isso indica que as dispersões utilizadas foram populações monodispersas de lipossomas. Esse nível de homogeneidade é interessante, uma vez que, como já evidenciado, o tamanho das vesículas pode influenciar na sua farmacodinâmica e conseqüentemente no seu efeito. Como no caso deste trabalho, o objetivo principal era o tratamento do AVE, e para que isso aconteça os lipossomas precisam chegar ao tecido cerebral, trabalhar com vesículas homogêneas também significa potencializar a ação conjunta dessas

vesículas, desempenhando o mesmo papel e assim produzindo um efeito mais eficaz, como o que foi visto no trabalho.

A eficácia de lipossomas carregados para tratamentos de doenças do SNC, no entanto, é um pouco contraditória. É intuitivo pensar que lipossomas catiônicos seriam mais indicados para atravessar a BHE devido a sua interação com proteínas negativas presentes nas membranas das células endoteliais dos capilares sanguíneos. E, como já foi citado, alguns trabalhos mostram o uso desses lipossomas para tratamento de doenças do SNC (Helm & Fricker, 2015).

Contudo, trabalhos como o de Campos-Martorell (Campos-Martorell et al., 2016) mostram o uso de lipossomas neutros e aniônicos como os mais propensos a se concentrarem na região isquêmica após o AVE. Além disso, Knudsen e colaboradores, ao compararem os efeitos toxicológicos da administração intravenosa e intracerebroventricular de lipossomas catiônicos e aniônicos, e mostraram que os lipossomas catiônicos causaram maiores alterações toxicológicas quando comparados com os aniônicos (Knudsen et al., 2014).

Portanto, ainda não há um senso comum sobre qual seria o melhor tipo de lipossoma carregado para uso no SNC. Devido a essa falta de consenso, neste trabalho foi escolhida a realização de lipossomas com carga elétrica superficial próxima a zero caracterizando um lipossoma neutro. E como podemos observar pelos resultados os lipossomas obtidos apresentaram uma carga aproximada de -2.4 mV próxima de zero podendo ser considerados lipossomas neutros.

Além disso, determinamos também a concentração da Ang-(1-7) nos lipossomas e a taxa de encapsulação do peptídeo. Obtivemos uma concentração de Ang-(1-7) de 0.078 mg/mL na suspensão, e uma taxa de encapsulação de 7.1% nos lipossomas. O protocolo de preparação da formulação de Ang-(1-7) com lipossomas foi realizado de acordo com Silva-Barcellos e colaboradores (Silva-Barcellos et al., 2001, p.) que obtiveram uma taxa de 15% para lipossomas de 200 nm. Como no nosso trabalho utilizamos lipossomas de 100 nm a redução no tamanho pode explicar a redução na taxa de encapsulação. Apesar de ser uma taxa baixa, a administração desses lipossomas foi capaz de chegar ao cérebro e tratar os animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média.

## 6.2 Protocolo agudo dos animais MCAO/Sham

Como foi demonstrado pelos resultados dos animais do grupo que passou pelo protocolo agudo, o lipossoma encapsulado com Ang-(1-7) foi o mais eficaz na redução do volume de infarto, mas o grupo que recebeu somente lipossomas vazios também apresentou uma redução no volume de infarto. O trabalho de Partoazar e colaboradores (Partoazar et al., 2017) também mostrou que lipossomas vazios foram capazes de reduzir o volume de infarto de animais devido a presença de lipídios com características antioxidantes na membrana dos lipossomas. Isso pode explicar o resultado visto em nosso trabalho, mas mesmo apresentando essa redução significativa do volume de infarto somente o lipossoma carregado com Ang-(1-7) foi capaz de reduzir mais de 50% do volume de infarto quando comparado com os grupos salina e o grupo que recebeu somente Ang-(1-7) livre.

Mecca e colaboradores (Mecca et al., 2011) foram o primeiro grupo a tratar ratos com Ang-(1-7) para tratamento de AVE. No caso deste trabalho, a Ang-(1-7) foi administrada anteriormente a ocorrência do AVE e diretamente no cérebro por meio de uma minibomba de infusão permitindo constante entrega do fármaco na região de interesse. Esse trabalho foi muito importante para mostrar o potencial da Ang-(1-7) no tratamento do AVE, mas uma terapia preventiva e ainda invasiva não é a melhor opção no caso da isquemia.

Após esse trabalho, outros foram publicados com a utilização de ratos e tratamento pós-isquemia com Ang-(1-7). Em 2018 Bennion e colaboradores (Bennion et al., 2018) utilizaram Ang-(1-7) acoplada a ciclodextrina, uma alternativa para aumentar o tempo de circulação desse peptídeo. Neste trabalho, para avaliação da ação neuroprotetora da Ang-(1-7) no AVE, o tratamento foi feito via oral em 3 ou 4 momentos diferentes (90 minutos, 4 horas, 1 e 2 dias após a isquemia – 125/250 µg/kg). Os ratos receberam, portanto, um total de aproximadamente 112,5 µg ou 150 µg de Ang-(1-7) ao final do tratamento, e os resultados mostraram a redução do volume de infarto e melhora funcional do animal.

Em 2019 Arroja e colaboradores (Arroja et al., 2019) também utilizaram Ang-(1-7) pós-isquemia para avaliar sua ação no tratamento do AVE. Neste trabalho como a Ang-(1-7) foi administrada na sua forma livre a via escolhida foi a intracerebroventricular com a utilização de uma minibomba de infusão com entrega de 1 µL de Ang-(1-7) por hora (1.1 nmol). Esse trabalho também mostrou redução no

volume de infarto. E em 2020, Kuipers e colaboradores (Kuipers et al., 2020) utilizaram uma formulação de Ang-(1-7) cíclica (angiotensina estabilizada com lantionina) para tratamento do AVE. Neste trabalho a Ang-(1-7) foi injetada via subcutânea ou por meio de uma bomba de infusão. O tratamento foi feito 24h após a isquemia por 28 dias a uma dose de 500µg/kg/dia. Nesse caso, os ratos ao final do tratamento receberam 4200µg de Ang-(1-7) e apresentaram melhora funcional.

Portanto, o potencial neuroprotetor da Ang-(1-7) no AVE vêm sendo amplamente confirmado e corroborado, mas um fator ainda problemático é o modelo terapêutico. Como pode ser observado pelos trabalhos anteriores, todos tiveram que utilizar um esquema terapêutico de mais de uma dose, com vias de administração diversas como intracerebroventricular, subcutânea e oral. E nenhum desses trabalhos apresentou uma redução no volume de infarto de 50%. A utilização dos lipossomas se mostrou bastante eficaz promovendo resultados ainda mais promissores com doses menores e esquema terapêutico reduzido. Isso foi observado no nosso trabalho, onde os animais receberam uma única dose de lipossomas equivalente a 7.8µg (223 µg/kg) de Ang-(1-7), e essa dose foi capaz de reduzir o volume de infarto em mais de 50%, além de também promover melhora funcional desses animais.

Essa dose, como pode se observar, é menor que a maioria das outras doses administradas nos trabalhos anteriores e foi capaz de promover um efeito maior. Apesar de estarmos utilizando a via intravenosa que é uma via invasiva e limita o uso do tratamento para nível hospitalar, esse resultado já é bastante promissor.

Além disso, como mostrado pelos nossos resultados o tratamento com a formulação de lipossomas com Ang-(1-7) em dose reduzida quando comparado com os outros grupos tratados (salina, lipo vazio, e Ang-(1-7) livre) foi o único capaz de promover melhora funcional, motora e sensorial dos animais, como mostrado pelo escore mNSS. Esse escore proporciona análise mais ampla dos déficits neurológicos apresentando uma escala que permite avaliação motora, sensorial e de reflexos do animal, por isso ele foi escolhido. E apesar de não ser uma análise mais específica de cada função esse escore é amplamente utilizado na avaliação funcional de animais que sofreram isquemia cerebral.

O fato de termos mostrado uma melhora significativa dos animais tratados com Ang-(1-7) lipo, quando comparado com os outros grupos, mostra que o aumento da eficácia da Ang-(1-7) proporcionado pelos lipossomas foi capaz de melhorar não só o

volume de infarto, mas também o desempenho funcional dos animais. Esse é um resultado muito importante, uma vez que somente a redução no volume de infarto sem correlação com melhora funcional pode indicar um tratamento, de uma maneira geral, não muito promissor, principalmente a nível translacional. No entanto, como vimos também essa melhora funcional, isso mostra que o tratamento lipossomal apresentou vantagens quando comparado aos outros tratamentos sendo uma estratégia promissora na terapia do AVE.

### **6.3 Protocolo crônico dos animais MCAO/Sham**

Os animais acompanhados de forma crônica foram pesados todos os dias com o intuito de acompanhar a recuperação de cada um deles. E o que podemos ver pelos resultados é que a queda do peso no dia seguinte à cirurgia (dia 1) é algo normal que acontece inclusive com o grupo Sham uma vez que todos ficam um pouco debilitados com a própria cirurgia e nenhum dos grupos consegue recuperar seu peso inicial de antes da cirurgia (dia 0) após os 7 dias. Mas com o passar dos dias, principalmente a partir do dia 4, o grupo Sham e o grupo MCAO Ang-(1-7) lipo 48h já se distinguem dos grupos MCAO salina e MCAO Ang-(1-7) lipo apresentando certa estabilização do peso. É interessante ver essa melhora de um dos grupos tratados (MCAO Ang-(1-7) lipo 48h) quando comparado ao grupo não tratado (MCAO salina) uma vez que era esperado que animais menos afetados pela isquemia conseguissem se alimentar melhor e ter uma melhora de peso quando comparado com os grupos mais afetados, o que foi também observado no grupo Sham. Portanto, também era esperado que o grupo Ang-(1-7) lipo obtivesse a melhora observada no grupo Ang-(1-7) lipo 48h. O fato de não termos visto essa melhora também no grupo Ang-(1-7) lipo pode ser talvez explicada pelo pequeno número de animais (4).

Além, do aumento de eficácia promovido pela utilização dos lipossomas o uso desse sistema permitiu a ampliação da janela temporal de atuação da Ang-(1-7) no tratamento do AVE. Como é possível observar pelos resultados dos animais crônicos, mais uma vez demonstramos o potencial da Ang-(1-7) lipossomal em reduzir o volume de infarto quando administrada imediatamente após a isquemia (tempo zero). Mas dessa vez, também realizamos o tratamento 48h após a cirurgia e ele foi tão eficaz quanto o realizado no tempo zero.

Como já mencionado, em 2019 foi publicado um artigo do grupo do professor Kostarelos (Al-Ahmady et al., 2019) mostrando que após a isquemia há duas janelas de tempo nas quais ocorre uma abertura da barreira hematoencefálica (BHE) aumentando a passagem de lipossomas por ela e entrada no SNC. Uma das janelas é bem depois da isquemia, quando há aumento da passagem dos lipossomas via transcitose. E nós abordamos essa janela nos primeiros grupos (agudo) que fizeram o tratamento imediatamente após a cirurgia. E como observamos nos resultados, esses animais apresentaram redução no volume de infarto e melhor desempenho no escore neurológico.

A segunda janela temporal mostrada pelo grupo do prof. Kostarelos foi de 48h após a isquemia, correspondendo há um aumento tanto da passagem via transcitose mas também a passagem paracelular devido a abertura física da BHE. Por isso resolvemos testar essa janela uma vez que ainda não há registros na literatura de tratamentos neuroprotetores 2 dias após a ocorrência da isquemia. Nossos resultados, mais uma vez, mostraram uma redução significativa do volume de infarto após o tratamento. Obtivemos uma redução de mais de 50% no volume de infarto sendo o primeiro trabalho a mostrar que somente uma dose reduzida de Ang-(1-7) lipossomal 48 horas após a isquemia foi capaz de reduzir consideravelmente o volume do infarto de animais que passaram por isquemia focal. Isso mostra a eficácia do tratamento em um momento mais tardio após a isquemia que provavelmente se deve a essa abertura da BHE com maior entrada de lipossomas no tecido cerebral. Esse resultado também é bastante interessante uma vez que aumenta a possibilidade de tratamento para o AVE podendo, em um contexto translacional, tratar um maior número de pacientes afetados.

A análise do volume de infarto de cada hemisfério mostrou o esperado, ou seja, um maior volume de infarto no hemisfério direito, que foi o afetado pela isquemia, quando comparado com o esquerdo. E mais uma vez, a redução significativa do volume de infarto causada pela formulação lipossomal de Ang-(1-7) foi observada. Com relação ao volume total dos cérebros, apesar de haver uma perda de massa encefálica após a isquemia devido a morte das células neuronais (Moreau et al., 2012; Sofroniew & Vinters, 2010), o volume total dos cérebros dos animais não diferiu entre os grupos experimentais após 7 dias da cirurgia. Isso pode ser um indicativo que 7 dias após a isquemia já seria um tempo suficiente para certa recuperação cerebral

não sendo possível detectar mais nenhuma alteração no volume dos cérebros dos animais dos diferentes grupos.

Já a análise do volume de infarto ao longo das fatias, também realizado pela primeira vez, mostra que a ação da Ang-(1-7) é mais eficaz nas fatias mais rostrais e ventrais quando comparadas às mais centrais. Como já citado anteriormente, após a ocorrência da isquemia, duas regiões de infarto podem ser classificadas. O core da lesão, onde há uma redução considerável no fluxo sanguíneo (mais de 80%) causando a morte rápida das células com poucas chances de recuperação, e a região da penumbra, onde a redução do fluxo sanguíneo, apesar de existente, não é tão brusca, devido a presença de vasos colaterais, o que induz danos, mas que podem ser revertidos com tratamentos eficazes. Portanto, a região da penumbra é a área de interesse de agentes neuroprotetores. Uma vez tratada eficientemente essa região não evolui para uma área de necrose aumentando a morte celular, o volume de infarto e perda tecidual e, conseqüentemente, de função.

Os resultados da análise da ação da Ang-(1-7) ao longo das fatias ao mostrarem um efeito mais ventral e rostral podem demonstrar essa ação neuroprotetora na região da penumbra proporcionando a sua redução, restando somente fatias mais centrais que provavelmente faziam parte do centro do dano e que, portanto, morrem rapidamente sendo mais difícil de serem recuperadas. E ao compararmos os grupos Ang-(1-7) lipo e Ang-(1-7) lipo 48h podemos observar que o número de fatias afetadas no primeiro grupo é menor do que no segundo o que poderia ser previsto uma vez que o segundo grupo só recebeu o tratamento 48h depois da ocorrência do infarto e esse tempo perdido resultou em maior quantidade de tecido afetado. Mas no final, a redução do volume de infarto total ainda foi considerável, o que demonstra o potencial desse sistema nanocarreador como tratamento para o AVE.

Os resultados dos escores realizados 24 horas e 7 dias após a isquemia no grupo Ang-(1-7) lipo corroboram com os anteriores do grupo agudo, mostrando o efeito da Ang-(1-7) na recuperação do tecido cerebral influenciando na menor perda tecidual e perda de função. Quando olhamos para o gráfico 17B, que mostra os valores dos escores 7 dias após a cirurgia, vemos que há uma melhora tanto do grupo MCAO salina quanto do grupo MCAO Ang-(1-7) lipo, quando comparado com os valores vistos no gráfico A da figura 17, e essa melhora já era esperada uma vez que é reportado que os animais apresentam melhora ao longo dos dias mesmo sem



nenhum tratamento (J. Chen et al., 2005; A. J. Hunter et al., 2000). Mas também podemos observar que o grupo MCAO Ang-(1-7) lipo obteve desempenho melhor que o grupo MCAO salina com valor de p próximo a 0.05, indicando que a melhora também pode ser observada após os 7 dias de cirurgia. Esses resultados mostram, mais uma vez, como o tratamento com a Ang-(1-7) encapsulada em lipossomas é bastante promissor e, o fato de Arroja e colaboradores não terem mostrado essa melhora dos animais no escore neurológico, 7 dias após a cirurgia de MCAO, tratando somente com Ang-(1-7) livre, também reforça o uso desse nanossistema (Arroja et al., 2019).

Nesse ponto é interessante observar que, as fatias que foram recuperadas no grupo MCAO Ang-(1-7) lipo foram fatias do córtex pré-frontal, estriado e cerebelo. Já as fatias que ainda apresentavam um volume de infarto considerável foram fatias de hipocampo, tanto ventrais, quanto rostrais. Dessa forma, funções exercidas por essas regiões (córtex, estriado e cerebelo), como a função motora, poderiam apresentar melhora, e isso foi confirmado com a melhora funcional dos animais por meio do escore neurológico.

Já os animais tratados 48h não apresentaram a mesma melhora funcional mostrada pelo outro grupo. Nesse caso, o tratamento tardio, mesmo reduzindo consideravelmente o volume de infarto, não foi tão eficaz em recuperar fatias tão ventrais e rostrais como visto no grupo tratado no tempo zero. Observando o gráfico 16C é possível perceber que um número maior de fatias ainda está afetado quando comparado com o grupo Ang-(1-7) lipo. Fatias essas que correspondem ao final do estriado e início do cerebelo. Isso pode explicar porque esses animais não tiveram um desempenho muito bom no escore a ponto de se diferenciar do grupo salina 7 dias após a isquemia.

O pequeno número de animais avaliados nesse escore também pode ter influenciado nesses resultados, mas a ausência da melhora funcional nesses animais reflete ainda uma dificuldade muito grande no contexto do AVE que é o tratamento tardio de pacientes. A redução do volume de infarto já é um resultado bastante animador que ainda não foi demonstrado na literatura e que deve ser explorado, mas a difícil tarefa de lutar contra o tempo em pacientes que sofreram AVE ainda é um grande problema em termos pré-clínicos e clínicos.

#### **6.4 Análises Bioquímicas**

Após a realização das imagens de ressonância magnética os animais foram sacrificados e seus cérebros coletados para a realização das análises de estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias, portanto, essas análises foram realizadas em cérebros de 7 dias após a cirurgia.

Como já vem sendo amplamente descrito na literatura, a cascata de eventos que ocorre durante a isquemia e reperfusão é caracterizada por ampla produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando ao estresse oxidativo, e também por liberação de citocinas inflamatórias gerando um processo de inflamação local (Bruch et al., 2019).

No estresse oxidativo há a liberação de malondialdeído (MDA), produto da lipoperoxidação causada pelas ROS (Gustaw-Rothenberg et al., 2010), e uma das enzimas endógenas mais importantes no combate a ROS é a superóxido dismutase (SOD), que tem como função eliminar radicais livres que possuam o ânion superóxido reduzindo a concentração dessas substâncias e conseqüentemente suas ações de dano ao tecido (Ma et al., 2019). Por isso, no nosso trabalho realizamos a quantificação do MDA (TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e de SOD como medidas de estresse oxidativo. Mas como foi possível observar pelos resultados do gráfico da figura 18, nenhuma dessas medidas apresentou alteração após o tratamento com Ang-(1-7) lipo. Contudo, se sabe que o processo de estresse oxidativo se dá nas primeiras horas após a ocorrência da isquemia e muitos trabalhos obtiveram resultados nessas medidas, inclusive para a Ang-(1-7), quando coletaram o tecido com aproximadamente 24h após a isquemia (Jiang et al., 2012; Ma et al., 2019) ou quando trataram os animais com agentes antioxidantes nas primeiras horas após a isquemia (Chamorro et al., 2016). Como coletamos o tecido com 7 dias, os efeitos do estresse oxidativo podem ter sido revertidos e por isso não conseguimos mais detectar as moléculas escolhidas.

Durante a cascata de dano celular proporcionado pela isquemia e reperfusão também ocorre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias e esse processo inflamatório tem início algumas horas após a isquemia e pode durar por semanas. Apesar da Ang-(1-7) já ter demonstrado efeitos anti-inflamatórios vistos nos momentos iniciais dos danos 24 a 72h (Jiang et al., 2012; Mecca et al., 2011) não foi possível observar esse efeito nos estágios mais tardios da inflamação, como

podemos ver no gráfico da figura 19 e também no trabalho de Arroja e colaboradores (Arroja et al., 2019).

Estudos mostram que apesar da inflamação persistir por dias os picos de muitas citocinas (IL1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) ocorre nas primeiras horas após a isquemia diminuindo 24 horas depois (Anrather & Iadecola, 2016). Além disso, um estudo clínico viu alterações nos níveis de IL-6 3 dias após a ocorrência do AVE (Chamorro et al., 2016). Portanto nossos resultados corroboram com os achados da literatura mostrando que provavelmente o pico dessas citocinas inflamatórias ocorre nos primeiros dias após a isquemia, e, portanto, 7 dias depois não é mais possível detectá-las.

### **6.5 Imunofluorescência**

A técnica de imunofluorescência foi realizada com o intuito de se avaliar a interação dos lipossomas encapsulando Ang-(1-7) com as células cerebrais (neurônio, astrócitos e micróglia). As áreas escolhidas para a realização dessa análise qualitativa foram as áreas mais afetadas pela isquemia, portanto, o córtex, o estriado, e, em alguns casos, o hipocampo.

Os resultados desses experimentos demonstraram que animais isquemiados apresentam aumento no acúmulo de lipossomas no tecido cerebral quando comparados com o grupo sham. Não foi possível observar, contudo, alta colocalização entre os lipossomas e nenhuma das células marcadas. Além de alta semelhança entre a disposição dos lipossomas e os vasos sanguíneos o que pode sugerir que essas nanopartículas apresentaram maior interação com as células endoteliais, possivelmente liberando a maior parte do seu conteúdo nesse local e assim tornando a quantidade de lipossomas que chega ao parênquima cerebral reduzida.

De fato, já é bem descrito que a BHE é um obstáculo para a passagem de substâncias ativas terapêuticas para o tecido cerebral, como explicado anteriormente. No entanto, também já é de conhecimento que após a isquemia há maior facilidade de entrada de substâncias e nanopartículas uma vez que a permeabilidade dessa barreira é alterada. E como esse aumento de permeabilidade ocorre, em maior escala, na região isquêmica há maior acúmulo de nanopartículas nessa região após o evento isquêmico. Isso já foi demonstrado em inúmeros trabalhos na literatura e

também por estudos prévios do nosso grupo (Al-Ahmady et al., 2019; Fukuta et al., 2016; Ishii et al., 2013).

Além disso, os resultados desse trabalho também demonstraram que os lipossomas foram capazes de aumentar a eficácia da Ang-(1-7) no tratamento do AVE. Dessa forma, uma hipótese considerada era a da interação desse nanossistema com as células do tecido cerebral reduzindo os danos causados na cascata fisiopatológica que ocorre após a isquemia e assim reduzindo o volume de infarto.

Um estudo publicado recentemente mostra que após injeção intravenosa e utilização de ultrassom, para abertura temporária da BHE, em animais saudáveis, os lipossomas foram capazes de interagir com os neurônios e micróglia, mas não com astrócitos na região do hipocampo (Morse et al., 2022). Contudo, outro estudo realizado em 2016 por Fukuta e colaboradores, também não conseguiu encontrar colocalização entre lipossomas e neurônios e micróglia (Fukuta et al., 2016). Nesse estudo, os animais sofreram isquemia e foram tratados com lipossomas imediatamente após a reperfusão. A interação dos lipossomas com células do tecido cerebral foi avaliada 3 e 24 horas após o tratamento. Além disso, outros dois estudos também relacionados ao tratamento da isquemia utilizando lipossomas demonstraram que os lipossomas interagem com células endoteliais da BHE (Ishii et al., 2013; Z. Wang et al., 2015) reduzindo o volume de infarto.

Esses dados podem sugerir que, após a isquemia, o tratamento com lipossomas permite a chegada dos mesmos à região cerebral, onde há imediata interação dos mesmos com as células endoteliais e a liberação do conteúdo terapêutico. Essa ação a nível da BHE já seria bastante benéfica uma vez que, é de conhecimento geral, que a melhora dos danos da BHE também é importante no tratamento de doenças cerebrais (Banks, 2016). Mas, além disso, outro possível mecanismo de ação seria a interação com as células endoteliais, mas liberação do conteúdo terapêutico no parênquima cerebral que então é capaz de interagir com as células do tecido cerebral reduzindo os efeitos danosos da isquemia.

Para a comprovação dessa hipótese seria necessária marcação do agente terapêutico, no nosso caso a Ang-(1-7), mas uma dificuldade nesse sentido é que ao marcar esse peptídeo ele se torna maior o que pode alterar a sua taxa de encapsulação no lipossoma e também o seu comportamento farmacodinâmico. Portanto, a realização desse tipo de estudo ainda é um pouco desafiadora. Mas,

sabendo que a Ang-(1-7) atua na redução do volume de infarto através de sua ação antioxidante e anti-inflamatória, como já demonstrado na literatura, é possível concluir que os lipossomas conseguem entregar a Ang-(1-7) ao tecido cerebral, tanto a nível das células endoteliais dos vasos sanguíneos, quanto também possivelmente a nível do parênquima cerebral. E, a partir de uma entrega, alvo específica e prolongada proporcionada pelos lipossomas, há o aumento da eficácia da ação desse peptídeo resultando em uma redução de mais de 50% do volume de infarto, tanto quando administrado imediatamente quanto 48 horas após a isquemia, e uma melhora no desempenho funcional desses animais.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados deste trabalho evidenciaram, mais uma vez, o potencial do peptídeo Angiotensina-(1-7), no tratamento do AVE agindo através da redução do volume de infarto e melhora funcional dos animais. Mas além disso, esse trabalho mostrou uma estratégia terapêutica ainda mais eficaz que a utilização da Ang-(1-7) livre. Essa estratégia se refere ao uso de lipossomas como carreadores da Ang-(1-7) para o cérebro para tratamento do AVE.

A utilização dos lipossomas para encapsular a Ang-(1-7) permitiu a redução da dose da Ang-(1-7) além do tratamento com uma única administração via intravenosa. Os animais tratados apresentaram redução de mais de 50% no volume de infarto tanto após receberem o tratamento imediatamente após a isquemia quanto 48 após o evento isquêmico. Além disso, também houve melhora no desempenho funcional desses animais.

Portanto, podemos concluir que a utilização de sistemas lipossomais como estratégia para carreamento e administração de Ang-(1-7) apresentou alto potencial terapêutico. Dessa forma, o contínuo desenvolvimento e estudo dessa estratégia, pode permitir o seu avanço para a área clínica possibilitando a chegada ao paciente que, atualmente, ainda se vê bastante dependente da sorte e de uma resposta fisiológica positiva após a ocorrência do AVE.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, N. J. (2005). Dynamics of CNS barriers: Evolution, differentiation, and modulation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1), 5–23. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-1374-y>
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Ahmad, S., Truran, S., Karamanova, N., Kindelin, A., Lozoya, M., Weissig, V., Emerson, H., Griffiths, D. R., Vail, T., Lifshitz, J., Ducruet, A. F., & Migrino, R. Q. (2021). Nanoliposomes Reduce Stroke Injury Following Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Stroke*, STROKEAHA121037120. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.037120>
- Ahmed, K. S., Hussein, S. A., Ali, A. H., Korma, S. A., Lipeng, Q., & Jinghua, C. (2018). Liposome: Composition, characterization, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting*, 1–58. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>
- Ahmed, K. S., Hussein, S. A., Ali, A. H., Korma, S. A., Lipeng, Q., & Jinghua, C. (2019). Liposome: Composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting*, 27(7), 742–761. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>
- Al-Ahmady, Z. S., Jasim, D., Ahmad, S. S., Wong, R., Haley, M., Coutts, G., Schiessl, I., Allan, S. M., & Kostarelos, K. (2019). Selective Liposomal Transport through Blood Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke Reveals Two Distinct Therapeutic

- Opportunities. *ACS Nano*, 13(11), 12470–12486.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01808>
- Alam, M. I., Beg, S., Samad, A., Baboota, S., Kohli, K., Ali, J., Ahuja, A., & Akbar, M. (2010). Strategy for effective brain drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 40(5), 385–403. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.003>
- Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C., & Yau-Young, A. (1991). Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1066(1), 29–36.
- Anderson, C. S., Heeley, E., Huang, Y., Wang, J., Stapf, C., Delcourt, C., Lindley, R., Robinson, T., Lavados, P., Neal, B., Hata, J., Arima, H., Parsons, M., Li, Y., Wang, J., Heritier, S., Li, Q., Woodward, M., Simes, R. J., ... INTERACT2 Investigators. (2013). Rapid blood-pressure lowering in patients with acute intracerebral hemorrhage. *The New England Journal of Medicine*, 368(25), 2355–2365.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214609>
- Anrather, J., & Iadecola, C. (2016). Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics*, 13(4), 661–670. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0483-x>
- Arroja, M. M. C., Reid, E., Roy, L. A., Vallatos, A. V., Holmes, W. M., Nicklin, S. A., Work, L. M., & McCabe, C. (2019). Assessing the effects of Ang-(1-7) therapy following transient middle cerebral artery occlusion. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39102-8>
- Bae, C. Y., & Sun, H. (2011). TRPM7 in cerebral ischemia and potential target for drug development in stroke. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(6), 725–733.  
<https://doi.org/10.1038/aps.2011.60>
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-IN27.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)

- Banks, W. A. (2016). From blood-brain barrier to blood-brain interface: New opportunities for CNS drug delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 15(4), 275–292.  
<https://doi.org/10.1038/nrd.2015.21>
- Barchet, T. M., & Amiji, M. M. (2009). Challenges and opportunities in CNS delivery of therapeutics for neurodegenerative diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(3), 211–225. <https://doi.org/10.1517/17425240902758188>
- Batista, C. M., Carvalho, C. M. B. de, & Magalhães, N. S. S. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 167–179. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>
- Battaglia, L., Panciani, P. P., Muntoni, E., Capucchio, M. T., Biasibetti, E., Bonis, P. D., Mioletti, S., Fontanella, M., & Swaminathan, S. (2018). Lipid nanoparticles for intranasal administration: Application to nose-to-brain delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15(4), 369–378. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1429401>
- Bennion, D. M., Jones, C. H., Donnangelo, L. L., Graham, J. T., Isenberg, J. D., Dang, A. N., Rodriguez, V., Sinisterra, R. D. M., Sousa, F. B., Santos, R. A. S., & Sumners, C. (2018). Neuroprotection by post-stroke administration of an oral formulation of angiotensin-(1-7) in ischaemic stroke. *Experimental Physiology*, 103(6), 916–923.  
<https://doi.org/10.1113/EP086957>
- Berkhemer, O. A., Jansen, I. G. H., Beumer, D., Fransen, P. S. S., van den Berg, L. A., Yoo, A. J., Lingsma, H. F., Sprengers, M. E. S., Jenniskens, S. F. M., Lycklama À Nijeholt, G. J., van Walderveen, M. A. A., van den Berg, R., Bot, J. C. J., Beenen, L. F. M., Boers, A. M. M., Slump, C. H., Roos, Y. B. W. E. M., van Oostenbrugge, R. J., Dippel, D. W. J., ... MR CLEAN Investigators. (2016). Collateral Status on Baseline Computed Tomographic Angiography and Intra-Arterial Treatment Effect in Patients With Proximal Anterior Circulation Stroke. *Stroke*, 47(3), 768–776.  
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011788>



- Bernardo-Castro, S., Albino, I., Barrera-Sandoval, Á. M., Tomatis, F., Sousa, J. A., Martins, E., Simões, S., Lino, M. M., Ferreira, L., & Sargento-Freitas, J. (2021). Therapeutic Nanoparticles for the Different Phases of Ischemic Stroke. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(6), 482. <https://doi.org/10.3390/life11060482>
- Bhatia, A., Kumar, R., & Prakash, O. (2004). Tamoxifen in topical liposomes: Development, characterization and in-vitro evaluation. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 7, 252–259.
- Boehme, A. K., Esenwa, C., & Elkind, M. S. V. (2017). Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circulation Research*, 120(3), 472–495. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398>
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975–999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Brain Stem Stroke | American Stroke Association*. (n.d.). Retrieved July 13, 2021, from <https://www.stroke.org/en/about-stroke/types-of-stroke/brain-stem-stroke>
- Brown, M. J. (2007). Renin: Friend or foe? *Heart (British Cardiac Society)*, 93(9), 1026–1033. <https://doi.org/10.1136/hrt.2006.107706>
- Bruch, G. E., Fernandes, L. F., Bassi, B. L. T., Alves, M. T. R., Pereira, I. O., Frézard, F., & Massensini, A. R. (2019). Liposomes for drug delivery in stroke. *Brain Research Bulletin*, 152, 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.07.015>
- Budai, M., & Szógyi, M. (2001). [Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes]. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 71(1), 114–118.
- Campagnole-Santos, M. J., Diz, D. I., Santos, R. A., Khosla, M. C., Brosnihan, K. B., & Ferrario, C. M. (1989). Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *The American Journal of Physiology*, 257(1 Pt 2), H324-329. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1989.257.1.H324>

- Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
- Campbell, B. C. V., & Khatri, P. (2020). Stroke. *The Lancet*, 396(10244), 129–142. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31179-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31179-X)
- Campos-Martorell, M., Cano-Sarabia, M., Simats, A., Hernández-Guillamon, M., Rosell, A., Maspoch, D., & Montaner, J. (2016). Charge effect of a liposomal delivery system encapsulating simvastatin to treat experimental ischemic stroke in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3035–3048. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107292>
- Cassidy, J. M., & Cramer, S. C. (2017). Spontaneous and Therapeutic-Induced Mechanisms of Functional Recovery After Stroke. *Translational Stroke Research*, 8(1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0467-5>
- Chalela, J. A., Kidwell, C. S., Nentwich, L. M., Luby, M., Butman, J. A., Demchuk, A. M., Hill, M. D., Patronas, N., Latour, L., & Warach, S. (2007). Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: A prospective comparison. *Lancet (London, England)*, 369(9558), 293–298. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60151-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60151-2)
- Chamorro, Á., Dirnagl, U., Urra, X., & Planas, A. M. (2016). Neuroprotection in acute stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *The Lancet. Neurology*, 15(8), 869–881. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00114-9)
- Charcosset, C., Juban, A., Valour, J.-P., Urbaniak, S., & Fessi, H. (2015). Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chemical Engineering Research and Design*, 94, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.09.008>
- Chen, J., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Zhang, L., Robin, A., Katakowski, M., Lu, M., & Chopp, M. (2005). Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the*

*International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(2), 281–290.

<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600034>

Chen, L., & Gao, X. (2017). The application of nanoparticles for neuroprotection in acute ischemic stroke. *Therapeutic Delivery*, 8(10), 915–928. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0023>

Chen, Y., & Liu, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 640–665. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>

Chilla, G. S., Tan, C. H., Xu, C., & Poh, C. L. (2015). Diffusion weighted magnetic resonance imaging and its recent trend—A survey. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 5(3), 407–422. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.03.01>

Chung, G. Y., Shim, K. H., Kim, H. J., Min, S. K., & Shin, H. S. (2018). *Chitosan-coated C-phycoerythrin Liposome for Extending the Neuroprotective Time Window Against Ischemic Brain Stroke* [Text]. <https://doi.org/info:doi/10.2174/1381612824666180515123543>

Coomer, B. L., & Stewart, P. A. (1985). Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvascular Research*, 30(1), 99–115. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(85\)90042-1](https://doi.org/10.1016/0026-2862(85)90042-1)

Costa, A. P., Xu, X., & Burgess, D. J. (2014). Freeze-Anneal-Thaw Cycling of Unilamellar Liposomes: Effect on Encapsulation Efficiency. *Pharmaceutical Research*, 31(1), 97–103. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1135-z>

Cruz-Flores, S., Rabinstein, A., Biller, J., Elkind, M. S. V., Griffith, P., Gorelick, P. B., Howard, G., Leira, E. C., Morgenstern, L. B., Ovbiagele, B., Peterson, E., Rosamond, W., Trimble, B., & Valderrama, A. L. (2011). Racial-Ethnic Disparities in Stroke Care: The American Experience. *Stroke*, 42(7), 2091–2116. <https://doi.org/10.1161/STR.0b013e3182213e24>

*Cryptogenic Stroke | NEJM.* (n.d.). Retrieved July 13, 2021, from

<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1503946>

Cui, W., Liu, R., Jin, H., Lv, P., Sun, Y., Men, X., Yang, S., Qu, X., Yang, Z., & Huang, Y.

(2016). PH gradient difference around ischemic brain tissue can serve as a trigger for delivering polyethylene glycol-conjugated urokinase nanogels. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 225, 53–63.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.028>

Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>

Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562–566.

<https://doi.org/10.1038/nature09513>

de Abreu, R. C., Fernandes, H., da Costa Martins, P. A., Sahoo, S., Emanuelli, C., & Ferreira, L. (2020). Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics. *Nature Reviews. Cardiology*, 17(11), 685–697.

<https://doi.org/10.1038/s41569-020-0389-5>

De Volder, M. F. L., Tawfick, S. H., Baughman, R. H., & Hart, A. J. (2013). Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. *Science*, 339(6119), 535–539. <https://doi.org/10.1126/science.1222453>

Dewar, D., Underhill, S. M., & Goldberg, M. P. (2003). Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(3), 263–274.

<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000053472.41007.F9>

Dhuria, S. V., Hanson, L. R., & Frey, W. H. (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(4), 1654–1673. <https://doi.org/10.1002/jps.21924>

- Dinda, S. C., & Pattnaik, G. (2013). Nanobiotechnology-based drug delivery in brain targeting. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *14*(15), 1264–1274.
- Ding, G., Jiang, Q., Li, L., Zhang, L., Zhang, Z. G., Ledbetter, K. A., Panda, S., Davarani, S. P. N., Athiraman, H., Li, Q., Ewing, J. R., & Chopp, M. (2008). Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *28*(8), 1440–1448. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.33>
- Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends in Neurosciences*, *22*(9), 391–397.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., & Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research*, *87*(5), E1-9. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>
- Drenjančević-Perić, I., Jelaković, B., Lombard, J. H., Kunert, M. P., Kibel, A., & Gros, M. (2011). High-salt diet and hypertension: Focus on the renin-angiotensin system. *Kidney & Blood Pressure Research*, *34*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1159/000320387>
- D'Souza, A., Dave, K. M., Stetler, R. A., & S. Manickam, D. (2021). Targeting the blood-brain barrier for the delivery of stroke therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *171*, 332–351. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.015>
- Durço, A. O., Souza, D. S. de, Heimfarth, L., Miguel-dos-Santos, R., Rabelo, T. K., Barreto, T. de O., Rhana, P., Santana, M. N. S., Braga, W. F., Cruz, J. dos S., Lauton-Santos, S., Santana-Filho, V. J. de, Barreto, R. de S. S., Guimarães, A. G., Alvarez-Leite, J. I., Júnior, L. J. Q., Vasconcelos, C. M. L. de, Santos, M. R. V. dos, & Barreto, A. S. (2019). D-Limonene Ameliorates Myocardial Infarction Injury by Reducing Reactive

- Oxygen Species and Cell Apoptosis in a Murine Model. *Journal of Natural Products*.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00523>
- Fagan, S. C., Lapchak, P. A., Liebeskind, D. S., Ishrat, T., & Ergul, A. (2013).  
Recommendations for preclinical research in hemorrhagic transformation.  
*Translational Stroke Research*, 4(3), 322–327. <https://doi.org/10.1007/s12975-012-0222-5>
- Feigin, V., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W., Dorsey, E., Elbaz, A., Ellenbogen, R., Fisher, J., Fitzmaurice, C., Giussani, G., Glennie, L., James, S., Johnson, C., Kassebaum, N., Logroscino, G., Marin, B., & Vos, T. (2019).  
Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18, 459–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)
- Fernandes, L. F., Bruch, G. E., Massensini, A. R., & Frézard, F. (2018). Recent Advances in the Therapeutic and Diagnostic Use of Liposomes and Carbon Nanomaterials in Ischemic Stroke. *Frontiers in Neuroscience*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00453>
- Fix, S. M., Borden, M. A., & Dayton, P. A. (2015). Therapeutic gas delivery via microbubbles and liposomes. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 209, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.027>
- Fontes, M. A., Silva, L. C., Campagnole-Santos, M. J., Khosla, M. C., Guertzenstein, P. G., & Santos, R. A. (1994). Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain Research*, 665(1), 175–180. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91171-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91171-1)
- Fraga-Silva, R. A., Costa-Fraga, F. P., Murça, T. M., Moraes, P. L., Martins Lima, A., Lautner, R. Q., Castro, C. H., Soares, C. M. A., Borges, C. L., Nadu, A. P., Oliveira, M. L., Shenoy, V., Katovich, M. J., Santos, R. A. S., Raizada, M. K., & Ferreira, A. J.

- (2013). Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 61(6), 1233–1238.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00627>
- Frézard, F. (1999). Liposomes: From biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(2). <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999000200006>
- Frézard, F., Schettini, D. A., & Demicheli, O. G. F. R. e C. (2005). Lipossomas: Propriedades Físico-Químicas e Farmacológicas, Aplicações na Quimioterapia à base de Antimônio. *Quimica Nova*, 28(3), 511–518.
- Fukuta, T., Asai, T., Sato, A., Namba, M., Yanagida, Y., Kikuchi, T., Koide, H., Shimizu, K., & Oku, N. (2016). Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil. *International Journal of Pharmaceutics*, 506(1–2), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.046>
- Fukuta, T., Asai, T., Yanagida, Y., Namba, M., Koide, H., Shimizu, K., & Oku, N. (2017). Combination therapy with liposomal neuroprotectants and tissue plasminogen activator for treatment of ischemic stroke. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(5), 1879–1890.  
<https://doi.org/10.1096/fj.201601209R>
- Fukuta, T., Ishii, T., Asai, T., Sato, A., Kikuchi, T., Shimizu, K., Minamino, T., & Oku, N. (2015). Treatment of stroke with liposomal neuroprotective agents under cerebral ischemia conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.09.020>
- Gabathuler, R. (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 48–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.028>
- Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A., & Barenholz, Y. (1994). Prolonged circulation time and enhanced accumulation in

malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Research*, 54(4), 987–992.

Gaspari, T. A., Vinh, A., Jones, E. S., & Widdop, R. E. (2012). Ganging up on angiotensin II type 1 receptors in vascular remodeling. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 60(1), 17–19. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.193375>

Gastaldi, L., Battaglia, L., Peira, E., Chirio, D., Muntoni, E., Solazzi, I., Gallarate, M., & Dosio, F. (2014). Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3), 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.05.004>

George, M. G., Tong, X., Kuklina, E. V., & Labarthe, D. R. (2011). Trends in stroke hospitalizations and associated risk factors among children and young adults, 1995–2008. *Annals of Neurology*, 70(5), 713–721. <https://doi.org/10.1002/ana.22539>

Ghanbarzadeh, S., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2013). Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. *BioImpacts: BI*, 3(2), 75–81. <https://doi.org/10.5681/bi.2013.016>

Gilmore, J. L., Yi, X., Quan, L., & Kabanov, A. V. (2008). Novel Nanomaterials for Clinical Neuroscience. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 3(2), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s11481-007-9099-6>

Ginsberg, M. D. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 55(3), 363–389. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.12.007>

Goldlust Eric J., Paczynski Richard P., He Yong Y., Hsu Chung Y., & Goldberg Mark P. (1996). Automated Measurement of Infarct Size With Scanned Images of Triphenyltetrazolium Chloride–Stained Rat Brains. *Stroke*, 27(9), 1657–1662. <https://doi.org/10.1161/01.STR.27.9.1657>



- Gregoriadis, G., da Silva, H., & Florence, A. T. (1990). A procedure for the efficient entrapment of drugs in dehydration-rehydration liposomes (DRVs). *International Journal of Pharmaceutics*, *65*(3), 235–242. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90148-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90148-W)
- Gregoriadis, G., Leathwood, P. D., & Ryman, B. E. (1971). Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters*, *14*(2), 95–99. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80109-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80109-6)
- Gregoriadis, G., Wills, E. J., Swain, C. P., & Tavill, A. S. (1974). Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet (London, England)*, *1*(7870), 1313–1316. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)90682-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)90682-5)
- Gu, Y., Zheng, G., Xu, M., Li, Y., Chen, X., Zhu, W., Tong, Y., Chung, S. K., Liu, K. J., & Shen, J. (2012). Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *Journal of Neurochemistry*, *120*(1), 147–156. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07542.x>
- Gulati, M., Grover, M., Singh, S., & Singh, M. (1998). Lipophilic drug derivatives in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, *165*(2), 129–168. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00006-4)
- Gullino, P. M., Grantham, F. H., Smith, S. H., & Haggerty, A. C. (1965). Modifications of the Acid-Base Status of the Internal Milieu of Tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *34*(6), 857–869. <https://doi.org/10.1093/jnci/34.6.857>
- Gustaw-Rothenberg, K., Kowalczyk, K., & Stryjecka-Zimmer, M. (2010). Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Geriatrics & Gerontology International*, *10*(2), 161–166. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2009.00571.x>
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K. R., Medeghri, Z., Machnig, T., Schneider, D., von Kummer, R., Wahlgren, N., Toni, D., & ECASS Investigators. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after

- acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 359(13), 1317–1329.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804656>
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O'Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M., & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55–60.  
<https://doi.org/10.1038/nature13165>
- Hankey, G. J. (2017). Stroke. *The Lancet*, 389(10069), 641–654.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30962-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30962-X)
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 173–185.  
<https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>
- Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association | Circulation*. (n.d.). Retrieved May 11, 2020, from  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000757>
- Heit, C., Jackson, B. C., McAndrews, M., Wright, M. W., Thompson, D. C., Silverman, G. A., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2013). Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily. *Human Genomics*, 7(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-7-22>
- Helm, F., & Fricker, G. (2015). Liposomal conjugates for drug delivery to the central nervous system. *Pharmaceutics*, 7(2), 27–42. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7020027>
- Holmes, D. (2013). The next big things are tiny. *The Lancet. Neurology*, 12(1), 31–32.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70313-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70313-7)
- Hopkins, S. J., & Rothwell, N. J. (1995). Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in Neurosciences*, 18(2), 83–88.
- Horenstein, R. B., Smith, D. E., & Mosca, L. (2002). Cholesterol Predicts Stroke Mortality in the Women's Pooling Project. *Stroke*, 33(7), 1863–1868.  
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000020093.67593.0B>

- Hornig, S., Therattil, A., Moyon, S., Gordon, A., Kim, K., Argaw, A. T., Hara, Y., Mariani, J. N., Sawai, S., Flodby, P., Crandall, E. D., Borok, Z., Sofroniew, M. V., Chapouly, C., & John, G. R. (2017). Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(8), 3136–3151.  
<https://doi.org/10.1172/JCI91301>
- Huang, J., Upadhyay, U. M., & Tamargo, R. J. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical Neurology*, *66*(3), 232–245.  
<https://doi.org/10.1016/j.surneu.2005.12.028>
- Hunter, A. J., Hatcher, J., Virley, D., Nelson, P., Irving, E., Hadingham, S. J., & Parsons, A. A. (2000). Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*, *39*(5), 806–816. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(99\)00262-2](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00262-2)
- Hunter, D. G., & Frisken, B. J. (1998). Effect of Extrusion Pressure and Lipid Properties on the Size and Polydispersity of Lipid Vesicles. *Biophysical Journal*, *74*(6), 2996–3002.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)78006-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)78006-3)
- Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends in Neurosciences*, *20*(3), 132–139. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10074-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10074-6)
- Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nature Medicine*, *17*(7), 796–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>
- Iadecola, C., Zhang, F., Xu, S., Casey, R., & Ross, M. E. (1995). Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *15*(3), 378–384. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1995.47>
- Illum, L. (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *11*(1), 1–18.

- Imaizumi, S., Woolworth, V., Fishman, R. A., & Chan, P. H. (1990). Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces cerebral infarction in cerebral ischemia in rats. *Stroke*, *21*(9), 1312–1317.
- Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattell, L. (2006). Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, *1*(3), 297–315.
- Inaba, S., Iwai, M., Tomono, Y., Senba, I., Furuno, M., Kanno, H., Okayama, H., Mogi, M., Higaki, J., & Horiuchi, M. (2009). Exaggeration of focal cerebral ischemia in transgenic mice carrying human Renin and human angiotensinogen genes. *Stroke*, *40*(2), 597–603. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.519801>
- Ishii, T., Asai, T., Fukuta, T., Oyama, D., Yasuda, N., Agato, Y., Shimizu, K., Minamino, T., & Oku, N. (2012). A single injection of liposomal asialo-erythropoietin improves motor function deficit caused by cerebral ischemia/reperfusion. *International Journal of Pharmaceutics*, *439*(1–2), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.026>
- Ishii, T., Asai, T., Oyama, D., Agato, Y., Yasuda, N., Fukuta, T., Shimizu, K., Minamino, T., & Oku, N. (2013). Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *27*(4), 1362–1370. <https://doi.org/10.1096/fj.12-221325>
- Jaafar-Maalej, C., Diab, R., Andrieu, V., Elaissari, A., & Fessi, H. (2010). Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of Liposome Research*, *20*(3), 228–243. <https://doi.org/10.3109/08982100903347923>
- Jackson, T. R., Blair, L. A., Marshall, J., Goedert, M., & Hanley, M. R. (1988). The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*, *335*(6189), 437–440. <https://doi.org/10.1038/335437a0>

- Jahn, F., Jordan, K., Behlendorf, T., Globig, C., Schmoll, H.-J., Müller-Tidow, C., & Jordan, B. (2015). Safety and Efficacy of Liposomal Cytarabine in the Treatment of Neoplastic Meningitis. *Oncology*, *89*(3), 137–142. <https://doi.org/10.1159/000380913>
- Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Hunt, S. V., Williams, A. F., Gatter, K. C., & Mason, D. Y. (1984). Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*, *312*(5990), 162. <https://doi.org/10.1038/312162a0>
- Jiang, T., Gao, L., Guo, J., Lu, J., Wang, Y., & Zhang, Y. (2012). Suppressing inflammation by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, *167*(7), 1520–1532. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02105.x>
- Jiang, T., Gao, L., Lu, J., & Zhang, Y.-D. (2013). ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Current Neuropharmacology*, *11*(2), 209–217. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311020007>
- Jiang, T., Yu, J.-T., Zhu, X.-C., Zhang, Q.-Q., Tan, M.-S., Cao, L., Wang, H.-F., Lu, J., Gao, Q., Zhang, Y.-D., & Tan, L. (2014). Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. *British Journal of Pharmacology*, *171*(18), 4222–4232. <https://doi.org/10.1111/bph.12770>
- Jilani, T. N., & Siddiqui, A. H. (2021). Tissue Plasminogen Activator. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507917/>
- Jones, T. A., & Schallert, T. (1992). Overgrowth and pruning of dendrites in adult rats recovering from neocortical damage. *Brain Research*, *581*(1), 156–160. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90356-e](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90356-e)
- Kamalian, S., & Lev, M. H. (2019). Stroke Imaging. *Radiologic Clinics of North America*, *57*(4), 717–732. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2019.02.001>

- Kapral, M. K., Fang, J., Hill, M. D., Silver, F., Richards, J., Jaigobin, C., & Cheung, A. M. (2005). Sex Differences in Stroke Care and Outcomes. *Stroke*, *36*(4), 809–814. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000157662.09551.e5>
- Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *The FEBS Journal*, *282*(21), 4067–4079. <https://doi.org/10.1111/febs.13412>
- Kenworthy, A. K., Hristova, K., Needham, D., & McIntosh, T. J. (1995). Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophysical Journal*, *68*(5), 1921–1936.
- Khalil, I. A., Yamada, Y., & Harashima, H. (2018). Optimization of siRNA delivery to target sites: Issues and future directions. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *15*(11), 1053–1065. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1520836>
- Kidwell, C. S., & Hsia, A. W. (2006). Imaging of the brain and cerebral vasculature in patients with suspected stroke: Advantages and disadvantages of CT and MRI. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *6*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s11910-996-0003-1>
- Kim, J.-Y., Kim, J.-K., Park, J.-S., Byun, Y., & Kim, C.-K. (2009). The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. *Biomaterials*, *30*(29), 5751–5756. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.021>
- Kirby, C. J., & Gregoriadis, G. (1984). Preparation of liposomes containing factor VIII for oral treatment of haemophilia. *Journal of Microencapsulation*, *1*(1), 33–45. <https://doi.org/10.3109/02652048409031535>
- Kissela, B. M., Khoury, J., Kleindorfer, D., Woo, D., Schneider, A., Alwell, K., Miller, R., Ewing, I., Moomaw, C. J., Szaflarski, J. P., Gebel, J., Shukla, R., & Broderick, J. P. (2005). Epidemiology of Ischemic Stroke in Patients With Diabetes: The Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. *Diabetes Care*, *28*(2), 355–359. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.2.355>

- Knowland, D., Arac, A., Sekiguchi, K. J., Hsu, M., Lutz, S. E., Perrino, J., Steinberg, G. K., Barres, B. A., Nimmerjahn, A., & Agalliu, D. (2014). Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. *Neuron*, *82*(3), 603–617. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.003>
- Knudsen, K. B., Northeved, H., Ek, P. K., Permin, A., Andresen, T. L., Larsen, S., Wegener, K. M., Lam, H. R., & Lykkesfeldt, J. (2014). Differential toxicological response to positively and negatively charged nanoparticles in the rat brain. *Nanotoxicology*, *8*(7), 764–774. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.829589>
- Kopp, U. C. (2011). Neural Control of Renal Function. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, *3*(4), 1–96. <https://doi.org/10.4199/C00034ED1V01Y201106ISP022>
- Krishnamurthi, R. V., Ikeda, T., & Feigin, V. L. (2020). Global, Regional and Country-Specific Burden of Ischaemic Stroke, Intracerebral Haemorrhage and Subarachnoid Haemorrhage: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Neuroepidemiology*, *54*(2), 171–179. <https://doi.org/10.1159/000506396>
- Kristián, T., & Siesjö, B. K. (1998). Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, *29*(3), 705–718. <https://doi.org/10.1161/01.str.29.3.705>
- Krueger, M., Härtig, W., Reichenbach, A., Bechmann, I., & Michalski, D. (2013). Blood-brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions. *PLoS One*, *8*(2), e56419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056419>
- Kuipers, A., Moll, G. N., Levy, A., Krakovsky, M., & Franklin, R. (2020). Cyclic angiotensin-(1-7) contributes to rehabilitation of animal performance in a rat model of cerebral stroke. *Peptides*, *123*, 170193. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170193>
- Lai, M. Z., Düzgüneş, N., & Szoka, F. C. (1985). Effects of replacement of the hydroxyl group of cholesterol and tocopherol on the thermotropic behavior of phospholipid membranes. *Biochemistry*, *24*(7), 1646–1653. <https://doi.org/10.1021/bi00328a012>

- Lamichhane, N., Udayakumar, T. S., D'Souza, W. D., Simone, C. B., Raghavan, S. R., Polf, J., & Mahmood, J. (2018). Liposomes: Clinical Applications and Potential for Image-Guided Drug Delivery. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(2).  
<https://doi.org/10.3390/molecules23020288>
- Lassmann, H., Brück, W., & Lucchinetti, C. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: Implications for diagnosis and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 7(3), 115–121.
- Lembrado hoje, Dia Mundial do AVC serve de alerta à população.* (2020, October 29). Agência Brasil. <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2020-10/lembrado-hoje-dia-mundial-do-avc-serve-de-alerta-populacao>
- Leslie-Mazwi, T. M., Hirsch, J. A., Falcone, G. J., Schaefer, P. W., Lev, M. H., Rabinov, J. D., Rost, N. S., Schwamm, L., & González, R. G. (2016). Endovascular Stroke Treatment Outcomes After Patient Selection Based on Magnetic Resonance Imaging and Clinical Criteria. *JAMA Neurology*, 73(1), 43–49.  
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.3000>
- Li, P., Stetler, R. A., Leak, R. K., Shi, Y., Li, Y., Yu, W., Bennett, M. V. L., & Chen, J. (2018). Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology*, 134(Pt B), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.011>
- Li, S., & Carmichael, S. T. (2006). Growth-associated gene and protein expression in the region of axonal sprouting in the aged brain after stroke. *Neurobiology of Disease*, 23(2), 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.03.011>
- Li, S.-D., & Huang, L. (2009). Nanoparticles evading the reticuloendothelial system: Role of the supported bilayer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1788(10), 2259–2266.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.06.022>
- Li, Y., Chopp, M., Chen, J., Wang, L., Gautam, S. C., Xu, Y. X., & Zhang, Z. (2000). Intraatrial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves



- functional recovery after stroke in adult mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(9), 1311–1319. <https://doi.org/10.1097/00004647-200009000-00006>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia*. <https://doi.org/10.17863/CAM.13305>
- Lin, C.-Y., Hsieh, H.-Y., Pitt, W. G., Huang, C.-Y., Tseng, I.-C., Yeh, C.-K., Wei, K.-C., & Liu, H.-L. (2015). Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening for non-viral, non-invasive, and targeted gene delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 212, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.010>
- Liu, H.-L., Fan, C.-H., Ting, C.-Y., & Yeh, C.-K. (2014). Combining microbubbles and ultrasound for drug delivery to brain tumors: Current progress and overview. *Theranostics*, 4(4), 432–444. <https://doi.org/10.7150/thno.8074>
- Lochhead, J. J., & Thorne, R. G. (2012). Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 614–628. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002>
- Lombardo, S. M., Schneider, M., Türelı, A. E., & Günday Türelı, N. (2020). Key for crossing the BBB with nanoparticles: The rational design. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 866–883. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.72>
- Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., & Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20(1), 84–91.
- Lopes, S. C. de A., Giuberti, C. dos S., Rocha, T. G. R., Ferreira, D. dos S., AmaralLeite, E., & Oliveira, M. C. (2013). Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. In *Cancer*

*Treatment—Conventional and Innovative Approaches*. IntechOpen.

<https://doi.org/10.5772/55290>

Love, S. (1999). Oxidative Stress in Brain Ischemia. *Brain Pathology*, 9(1), 119–131.

<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00214.x>

Lu, J., Jiang, T., Wu, L., Gao, L., Wang, Y., Zhou, F., Zhang, S., & Zhang, Y. (2013). The expression of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis are upregulated after acute cerebral ischemic stroke in rats. *Neuropeptides*, 47(5), 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.09.002>

Lu, Y., Li, C., Chen, Q., Liu, P., Guo, Q., Zhang, Y., Chen, X., Zhang, Y., Zhou, W., Liang, D., Zhang, Y., Sun, T., Lu, W., & Jiang, C. (2019). Microthrombus-Targeting Micelles for Neurovascular Remodeling and Enhanced Microcirculatory Perfusion in Acute Ischemic Stroke. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 31(21), e1808361.

<https://doi.org/10.1002/adma.201808361>

Luo, T., Wang, J., Hao, S., Guo, T., Ren, P., Cheng, Z., Gao, F., Gong, Y., & Wang, B. (2017). Brain Drug Delivery Systems for the Stroke Intervention and Recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 23(15), 2258–2267.

<https://doi.org/10.2174/1381612822666161025155058>

Ma, W., Wang, S., Liu, X., Tang, F., Zhao, P., Cheng, K., Zheng, Q., Zhuo, Y., Zhao, X., Li, X., & Feng, W. (2019). Protective effect of troxerutin and cerebroprotein hydrolysate injection on cerebral ischemia through inhibition of oxidative stress and promotion of angiogenesis in rats. *Molecular Medicine Reports*, 19(4), 3148–3158.

<https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9960>

Makino, I., Shibata, K., Ohgami, Y., Fujiwara, M., & Furukawa, T. (1996). Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain. *Neuropeptides*, 30(6), 596–601. [https://doi.org/10.1016/s0143-4179\(96\)90043-8](https://doi.org/10.1016/s0143-4179(96)90043-8)

Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase.

- European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Masserini, M. (2013). *Nanoparticles for Brain Drug Delivery* [Research article]. *International Scholarly Research Notices*. <https://doi.org/10.1155/2013/238428>
- Mathai, J. C., & Sitaraman, V. (1987). Preparation of large uni-lamellar liposomes by the ether injection method and evaluation of the physical integrity by osmometry. *Biochemical Education*, 15(3), 147–149. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(87\)90052-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(87)90052-5)
- Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R., & Janoff, A. S. (1985). Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 817(1), 193–196.
- Mayer, S. A., & Rincon, F. (2005). Treatment of intracerebral haemorrhage. *The Lancet. Neurology*, 4(10), 662–672. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70195-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70195-2)
- Mecca, A. P., Regenhardt, R. W., O'Connor, T. E., Joseph, J. P., Raizada, M. K., Katovich, M. J., & Sumners, C. (2011). Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Experimental Physiology*, 96(10), 1084–1096. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.058578>
- Mercier, C., Maseguin, C., Roux, F., Gabrion, J., & Scherrmann, J.-M. (2004). Expression of P-glycoprotein (ABCB1) and Mrp1 (ABCC1) in adult rat brain: Focus on astrocytes. *Brain Research*, 1021(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.034>
- Meredith, M. E., Salameh, T. S., & Banks, W. A. (2015). Intranasal Delivery of Proteins and Peptides in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *The AAPS Journal*, 17(4), 780–787. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9719-7>
- Merino, M., Zalba, S., & Garrido, M. J. (2018). Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 275, 162–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.015>

- Meyne, J. K., Zimmermann, P. R., Rohr, A., Riedel, C., Hansen, H. C., Pulkowski, U., Thie, A., Holst, T., Papengut, F., Stinge, R., Schepelmann, K., Jansen, O., Deuschl, G., & Binder, A. (2015). Thrombectomy vs. Systemic Thrombolysis in Acute Embolic Stroke with High Clot Burden: A Retrospective Analysis. *RoFo: Fortschritte Auf Dem Gebiete Der Rontgenstrahlen Und Der Nuklearmedizin*, 187(7), 555–560.  
<https://doi.org/10.1055/s-0034-1399222>
- Milla, P., Dosio, F., & Cattell, L. (2012). PEGylation of proteins and liposomes: A powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Current Drug Metabolism*, 13(1), 105–119.
- Moreau, F., Patel, S., Lauzon, M. L., McCreary, C. R., Goyal, M., Frayne, R., Demchuk, A. M., Coutts, S. B., & Smith, E. E. (2012). Cavitation after acute symptomatic lacunar stroke depends on time, location, and MRI sequence. *Stroke*, 43(7), 1837–1842.  
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.647859>
- Moreno, L. C. G. e A. I., Cavalcanti, I. M. F., Satyal, P., Santos-Magalhães, N. S., Rolim, H. M. L., & Freitas, R. M. (2015). Acute toxicity and anticonvulsant activity of liposomes containing nimodipine on pilocarpine-induced seizures in mice. *Neuroscience Letters*, 585, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.11.025>
- Morse, S. V., Mishra, A., Chan, T. G., T. M. de Rosales, R., & Choi, J. J. (2022). Liposome delivery to the brain with rapid short-pulses of focused ultrasound and microbubbles. *Journal of Controlled Release*, 341, 605–615.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.12.005>
- Moustafa, R. R., & Baron, J.-C. (2007). Clinical review: Imaging in ischaemic stroke – implications for acute management. *Critical Care*, 11(5), 227.  
<https://doi.org/10.1186/cc5973>
- Mugabe, C., Azghani, A. O., & Omri, A. (2006). Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide

antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(2), 244–250.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.005>

Nayar, R., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (1989). Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 986(2), 200–206.

[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90468-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90468-9)

Neuwelt, E., Abbott, N. J., Abrey, L., Banks, W. A., Blakley, B., Davis, T., Engelhardt, B., Grammas, P., Nedergaard, M., Nutt, J., Pardridge, W., Rosenberg, G. A., Smith, Q., & Drewes, L. R. (2008). Strategies to advance translational research into brain barriers. *The Lancet. Neurology*, 7(1), 84–96. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70326-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70326-5)

Onyskiw, P. J., & Eniola-Adefeso, O. (2013). Effect of PEGylation on ligand-based targeting of drug carriers to the vascular wall in blood flow. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 29(35), 11127–11134. <https://doi.org/10.1021/la402182j>

Pardridge, W. M. (1999). Vector-mediated drug delivery to the brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36(2), 299–321. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00087-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00087-8)

Pardridge, W. M. (2007). Drug targeting to the brain. *Pharmaceutical Research*, 24(9), 1733–1744. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9324-2>

Partoazar, A., Nasoohi, S., Rezayat, S. M., Gilani, K., Mehr, S. E., Amani, A., Rahimi, N., & Dehpour, A. R. (2017). Nanoliposome containing cyclosporine A reduced neuroinflammation responses and improved neurological activities in cerebral ischemia/reperfusion in rat. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 31(2), 185–193. <https://doi.org/10.1111/fcp.12244>

Pashirova, T. N., Zueva, I. V., Petrov, K. A., Lukashenko, S. S., Nizameev, I. R., Kulik, N. V., Voloshina, A. D., Almasy, L., Kadirov, M. K., Masson, P., Souto, E. B., Zakharova, L. Ya., & Sinyashin, O. G. (2018). Mixed cationic liposomes for brain delivery of drugs by the intranasal route: The acetylcholinesterase reactivator 2-PAM as encapsulated

- drug model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 358–367.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.049>
- Patel, P., Yavagal, D., & Khandelwal, P. (2020). Hyperacute Management of Ischemic Strokes. *Journal of the American College of Cardiology*, 75(15), 1844–1856.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.006>
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., & Abu-Izneid, T. (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091>
- Peng, T., Britton, G. L., Kim, H., Cattano, D., Aronowski, J., Grotta, J., McPherson, D. D., & Huang, S.-L. (2013). Therapeutic time window and dose dependence of xenon delivered via echogenic liposomes for neuroprotection in stroke. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(10), 773–784. <https://doi.org/10.1111/cns.12159>
- Power, C., Henry, S., Del Bigio, M. R., Larsen, P. H., Corbett, D., Imai, Y., Yong, V. W., & Peeling, J. (2003). Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Annals of Neurology*, 53(6), 731–742.  
<https://doi.org/10.1002/ana.10553>
- Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B. M., Hoh, B., Jauch, E. C., Kidwell, C. S., Leslie-Mazwi, T. M., Ovbiagele, B., Scott, P. A., Sheth, K. N., Southerland, A. M., Summers, D. V., & Tirschwell, D. L. (2018). 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*, 49(3), e46–e99. <https://doi.org/10.1161/STR.000000000000158>
- Praça, C., Rai, A., Santos, T., Cristovão, A. C., Pinho, S. L., Cecchelli, R., Dehouck, M.-P., Bernardino, L., & Ferreira, L. S. (2018). A nanoformulation for the preferential accumulation in adult neurogenic niches. *Journal of Controlled Release: Official*

*Journal of the Controlled Release Society*, 284, 57–72.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.013>

Qin, L., Wang, C.-Z., Fan, H.-J., Zhang, C.-J., Zhang, H.-W., Lv, M.-H., & Cui, S.-D. (2014).

A dual-targeting liposome conjugated with transferrin and arginine-glycine-aspartic acid peptide for glioma-targeting therapy. *Oncology Letters*, 8(5), 2000–2006.

<https://doi.org/10.3892/ol.2014.2449>

Que, M., Schiene, K., Witte, O. W., & Zilles, K. (1999). Widespread up-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors after focal photothrombotic lesion in rat brain.

*Neuroscience Letters*, 273(2), 77–80. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00598-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00598-4)

Qureshi, A. I., Palesch, Y. Y., Barsan, W. G., Hanley, D. F., Hsu, C. Y., Martin, R. L., Moy, C.

S., Silbergleit, R., Steiner, T., Suarez, J. I., Toyoda, K., Wang, Y., Yamamoto, H.,

Yoon, B.-W., & ATACH-2 Trial Investigators and the Neurological Emergency

Treatment Trials Network. (2016). Intensive Blood-Pressure Lowering in Patients with

Acute Cerebral Hemorrhage. *The New England Journal of Medicine*, 375(11), 1033–

1043. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1603460>

Rafii, M. S., & Hillis, A. E. (2006). Compendium of cerebrovascular diseases. *International*

*Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 18(5), 395–407.

<https://doi.org/10.1080/09540260600935405>

Redecker, C., Wang, W., Fritschy, J.-M., & Witte, O. W. (2002). Widespread and long-lasting

alterations in GABA(A)-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats:

Mediation by NMDA-dependent processes. *Journal of Cerebral Blood Flow and*

*Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and*

*Metabolism*, 22(12), 1463–1475.

<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000034149.72481.BD>

Regenhardt, R. W., Bennion, D. M., & Sumners, C. (2014). Cerebroprotective action of

angiotensin peptides in stroke. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 126(3),

195–205. <https://doi.org/10.1042/CS20130324>

- Regenhardt, R. W., Mecca, A. P., Desland, F., Ritucci-Chinni, P. F., Ludin, J. A., Greenstein, D., Banuelos, C., Bizon, J. L., Reinhard, M. K., & Sumners, C. (2014). Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Experimental Physiology*, *99*(2), 442–453.  
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.075242>
- Rentzsch, B., Todiras, M., Iliescu, R., Popova, E., Campos, L. A., Oliveira, M. L., Baltatu, O. C., Santos, R. A., & Bader, M. (2008). Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *52*(5), 967–973.  
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114322>
- Rip, J. (2016). Liposome technologies and drug delivery to the CNS. *Drug Discovery Today. Technologies*, *20*, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2016.07.005>
- Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *323*, 170–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007>
- Ronaldson, P. T., & Davis, T. P. (2012). Blood-brain barrier integrity and glial support: Mechanisms that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. *Current Pharmaceutical Design*, *18*(25), 3624–3644.
- Rueda Domínguez, A., Olmos Hidalgo, D., Viciano Garrido, R., & Torres Sánchez, E. (2005). Liposomal cytarabine (DepoCyte) for the treatment of neoplastic meningitis. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *7*(6), 232–238.  
<https://doi.org/10.1007/BF02710168>
- Sacco, R. L., Benson, R. T., Kargman, D. E., Boden-Albala, B., Tuck, C., Lin, I. F., Cheng, J. F., Paik, M. C., Shea, S., & Berglund, L. (2001). High-density lipoprotein cholesterol and ischemic stroke in the elderly: The Northern Manhattan Stroke Study. *JAMA*, *285*(21), 2729–2735. <https://doi.org/10.1001/jama.285.21.2729>



- Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J. (Buddy), Culebras, A., Elkind, M. S. V., George, M. G., Hamdan, A. D., Higashida, R. T., Hoh, B. L., Janis, L. S., Kase, C. S., Kleindorfer, D. O., Lee, J.-M., Moseley, M. E., Peterson, E. D., Turan, T. N., Valderrama, A. L., & Vinters, H. V. (2013). An Updated Definition of Stroke for the 21st Century. *Stroke*, *44*(7), 2064–2089.  
<https://doi.org/10.1161/STR.0b013e318296aeca>
- Sakamoto, A., & Ido, T. (1993). Liposome targeting to rat brain: Effect of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Brain Research*, *629*(1), 171–175.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90499-d](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90499-d)
- Santo, I. E., Campardelli, R., Albuquerque, E. C., de Melo, S. V., Della Porta, G., & Reverchon, E. (2014). Liposomes preparation using a supercritical fluid assisted continuous process. *Chemical Engineering Journal*, *249*, 153–159.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.099>
- Santos, R. A., Brosnihan, K. B., Chappell, M. C., Pesquero, J., Chernicky, C. L., Greene, L. J., & Ferrario, C. M. (1988). Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *11*(2 Pt 2), 1153-157.
- Santos, R. A. S., Oudit, G. Y., Verano-Braga, T., Canta, G., Steckelings, U. M., & Bader, M. (2019). The renin-angiotensin system: Going beyond the classical paradigms. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *316*(5), H958–H970. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00723.2018>
- Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., & Campagnole-Santos, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews*, *98*(1), 505–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>
- Santos, S. D., Xavier, M., Leite, D. M., Moreira, D. A., Custódio, B., Torrado, M., Castro, R., Leiro, V., Rodrigues, J., Tomás, H., & Pêgo, A. P. (2018). PAMAM dendrimers: Blood-brain barrier transport and neuronal uptake after focal brain ischemia. *Journal*

*of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 291, 65–79.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.006>

Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2016).

Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 235, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>

Saver, J. L. (2006). Time is brain—Quantified. *Stroke*, 37(1), 263–266.

<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000196957.55928.ab>

Saxena, V., Gacchina Johnson, C., Negussie, A. H., Sharma, K. V., Dreher, M. R., & Wood,

B. J. (2015). Temperature-sensitive liposome-mediated delivery of thrombolytic agents. *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 31(1), 67–73. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.991428>

Scherrmann, J. M. (2002). Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascular*

*Pharmacology*, 38(6), 349–354.

Schiavone, M. T., Santos, R. A., Brosnihan, K. B., Khosla, M. C., & Ferrario, C. M. (1988).

Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), 4095–4098.

<https://doi.org/10.1073/pnas.85.11.4095>

Schmidt-Pogoda, A., Bonberg, N., Koecke, M. H. M., Strecker, J.-K., Wellmann, J.,

Bruckmann, N.-M., Beuker, C., Schäbitz, W.-R., Meuth, S. G., Wiendl, H., Minnerup, H., & Minnerup, J. (2020). Why Most Acute Stroke Studies Are Positive in Animals but Not in Patients: A Systematic Comparison of Preclinical, Early Phase, and Phase 3 Clinical Trials of Neuroprotective Agents. *Annals of Neurology*, 87(1), 40–51.

<https://doi.org/10.1002/ana.25643>

- Seevinck, P. R., Deddens, L. H., & Dijkhuizen, R. M. (2010). Magnetic resonance imaging of brain angiogenesis after stroke. *Angiogenesis*, *13*(2), 101–111.  
<https://doi.org/10.1007/s10456-010-9174-0>
- Silva-Barcellos, N. M., Frézard, F., Caligiorne, S., & Santos, R. A. (2001). Long-lasting cardiovascular effects of liposome-entrapped angiotensin-(1-7) at the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, *38*(6), 1266–1271.
- Simões, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Düzgüneş, N., & de Lima, M. C. P. (2004). On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *56*(7), 947–965. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.038>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Sopyan, I., Kurniawansyah, I., & Gozali, D. (2020). *A Review: A Novel of Efforts to Enhance Liposome Stability as Drug Delivery Approach*. 2020.  
<https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.85>
- Spuch, C., & Navarro, C. (2011). Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). *Journal of Drug Delivery*, *2011*, 469679. <https://doi.org/10.1155/2011/469679>
- Stenman, E., & Edvinsson, L. (2004). Cerebral ischemia enhances vascular angiotensin AT1 receptor-mediated contraction in rats. *Stroke*, *35*(4), 970–974.  
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000121642.53822.58>
- Supaporn, S. (2011). Effect of Freeze-Thawing Process on the Size and Lamellarity of PEG-Lipid Liposomes. *The Open Colloid Science Journal*, *4*(1), 1–8.  
<https://doi.org/10.2174/1876530001104010001>
- Swenson, C. E., Bolcsak, L. E., Batist, G., Guthrie, T. H., Tkaczuk, K. H., Boxenbaum, H., Welles, L., Chow, S.-C., Bhamra, R., & Chaikin, P. (2003). Pharmacokinetics of doxorubicin administered i.v. As Myocet (TLC D-99; liposome-encapsulated doxorubicin citrate) compared with conventional doxorubicin when given in

- combination with cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 14(3), 239–246. <https://doi.org/10.1097/00001813-200303000-00008>
- Tajes, M., Ramos-Fernández, E., Weng-Jiang, X., Bosch-Morató, M., Guivernau, B., Eraso-Pichot, A., Salvador, B., Fernández-Busquets, X., Roquer, J., & Muñoz, F. J. (2014). The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular Membrane Biology*, 31(5), 152–167. <https://doi.org/10.3109/09687688.2014.937468>
- Tam, V. H., Sosa, C., Liu, R., Yao, N., & Priestley, R. D. (2016). Nanomedicine as a non-invasive strategy for drug delivery across the blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 515(1–2), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.031>
- Tanaka, K., Nogawa, S., Suzuki, S., Dembo, T., & Kosakai, A. (2003). Upregulation of oligodendrocyte progenitor cells associated with restoration of mature oligodendrocytes and myelination in peri-infarct area in the rat brain. *Brain Research*, 989(2), 172–179. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)03317-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)03317-1)
- Tapeinos, C., Battaglini, M., & Ciofani, G. (2017). Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 264, 306–332. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.033>
- Tarassishin, L., Suh, H.-S., & Lee, S. C. (2014). LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: Role of CD14. *Glia*, 62(6), 999–1013. <https://doi.org/10.1002/glia.22657>
- Teasell, R., Foley, N., Doherty, T., & Finestone, H. (2002). Clinical characteristics of patients with brainstem strokes admitted to a rehabilitation unit. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 83(7), 1013–1016. <https://doi.org/10.1053/apmr.2002.33102>
- Teng, H., Zhang, Z. G., Wang, L., Zhang, R. L., Zhang, L., Morris, D., Gregg, S. R., Wu, Z., Jiang, A., Lu, M., Zlokovic, B. V., & Chopp, M. (2008). Coupling of angiogenesis and

neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke.

*Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(4), 764–771.

<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600573>

Thomsen, L. B., Thomsen, M. S., & Moos, T. (2015). Targeted drug delivery to the brain using magnetic nanoparticles. *Therapeutic Delivery*, 6(10), 1145–1155.

<https://doi.org/10.4155/tde.15.56>

Thomsen, M. S., Routhe, L. J., & Moos, T. (2017). The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(10), 3300–3317. <https://doi.org/10.1177/0271678X17722436>

Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., & Turner, A. J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33238–33243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002615200>

Tonnaer, J. A., Wiegant, V. M., & de Jong, W. (1982). Subcellular localization in rat brain of angiotensin I-generating endopeptidase activity distinct from cathepsin D. *Journal of Neurochemistry*, 38(5), 1356–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb07913.x>

Torchilin, V. P., Zhou, F., & Huang, L. (1993). PH-Sensitive Liposomes. *Journal of Liposome Research*, 3(2), 201–255. <https://doi.org/10.3109/08982109309148213>

van der Valk, F. M., van Wijk, D. F., Lobatto, M. E., Verberne, H. J., Storm, G., Willems, M. C. M., Legemate, D. A., Nederveen, A. J., Calcagno, C., Mani, V., Ramachandran, S., Paridaans, M. P. M., Otten, M. J., Dallinga-Thie, G. M., Fayad, Z. A., Nieuwdorp, M., Schulte, D. M., Metselaar, J. M., Mulder, W. J. M., & Stroes, E. S. (2015). Prednisolone-containing liposomes accumulate in human atherosclerotic

- macrophages upon intravenous administration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(5), 1039–1046. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.021>
- van Woensel, M., Wauthoz, N., Rosière, R., Amighi, K., Mathieu, V., Lefranc, F., van Gool, S. W., & de Vleeschouwer, S. (2013). Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM? *Cancers*, 5(3), 1020–1048. <https://doi.org/10.3390/cancers5031020>
- Verdecchia, P., Angeli, F., Mazzotta, G., Gentile, G., & Reboldi, G. (2008). The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: Role of aliskiren in risk reduction. *Vascular Health and Risk Management*, 4(5), 971–981.
- Vilela, P., & Rowley, H. A. (2017). Brain ischemia: CT and MRI techniques in acute ischemic stroke. *European Journal of Radiology*, 96, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2017.08.014>
- Vorbrodt, A. W. (1989). Ultracytochemical characterization of anionic sites in the wall of brain capillaries. *Journal of Neurocytology*, 18(3), 359–368.
- Wang, D., Sun, Y., Liu, Y., Meng, F., & Lee, R. J. (2018). Clinical translation of immunoliposomes for cancer therapy: Recent perspectives. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15(9), 893–903. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1517747>
- Wang, H., Xu, X., Guan, X., Shen, S., Huang, X., Kai, G., Zhao, S., Ruan, W., Zhang, L., Pang, T., & Mo, R. (2020). Liposomal 9-Aminoacridine for Treatment of Ischemic Stroke: From Drug Discovery to Drug Delivery. *Nano Letters*, 20(3), 1542–1551. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b04018>
- Wang, S., & Head, B. P. (2019). Caveolin-1 in Stroke Neuropathology and Neuroprotection: A Novel Molecular Therapeutic Target for Ischemic-Related Injury. *Current Vascular Pharmacology*, 17(1), 41–49. <https://doi.org/10.2174/1570161116666180206112215>
- Wang, Z., Zhao, Y., Jiang, Y., Lv, W., Wu, L., Wang, B., Lv, L., Xu, Q., & Xin, H. (2015). Enhanced anti-ischemic stroke of ZL006 by T7-conjugated PEGylated liposomes drug delivery system. *Scientific Reports*, 5, 12651. <https://doi.org/10.1038/srep12651>

- Wardlaw, J. M., Murray, V., Berge, E., del Zoppo, G., Sandercock, P., Lindley, R. L., & Cohen, G. (2012). Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: An updated systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, 379(9834), 2364–2372. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60738-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60738-7)
- Wen, C.-J., Zhang, L.-W., Al-Suwayeh, S. A., Yen, T.-C., & Fang, J.-Y. (2012). Theranostic liposomes loaded with quantum dots and apomorphine for brain targeting and bioimaging. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1599–1611. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29369>
- Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports: PR*, 64(5), 1020–1037. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(12)70901-5)
- Winkler, E. A., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature Neuroscience*, 14(11), 1398–1405. <https://doi.org/10.1038/nn.2946>
- Wright, J. W., & Harding, J. W. (2013). The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 465(1), 133–151. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1102-2>
- Wu, Q. J., & Tymianski, M. (2018). Targeting NMDA receptors in stroke: New hope in neuroprotection. *Molecular Brain*, 11(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0357-8>
- Yaghi, S., Bernstein, R. A., Passman, R., Okin, P. M., & Furie, K. L. (2017). Cryptogenic Stroke. *Circulation Research*, 120(3), 527–540. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308447>
- Yang, H. Y., Erdős, E. G., & Chiang, T. S. (1968). New enzymatic route for the inactivation of angiotensin. *Nature*, 218(5148), 1224–1226. <https://doi.org/10.1038/2181224a0>
- Ying, X., Wen, H., Lu, W.-L., Du, J., Guo, J., Tian, W., Men, Y., Zhang, Y., Li, R.-J., Yang, T.-Y., Shang, D.-W., Lou, J.-N., Zhang, L.-R., & Zhang, Q. (2010). Dual-targeting

- daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 141(2), 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.09.020>
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., & Wigler, M. (1986). Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*, 45(5), 711–719. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90785-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90785-3)
- Yu, J., Wang, W.-N., Matei, N., Li, X., Pang, J.-W., Mo, J., Chen, S.-P., Tang, J.-P., Yan, M., & Zhang, J. H. (2020). Ezetimibe Attenuates Oxidative Stress and Neuroinflammation via the AMPK/Nrf2/TXNIP Pathway after MCAO in Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 4717258. <https://doi.org/10.1155/2020/4717258>
- Zhang, L. I., Tao, H. W., Holt, C. E., Harris, W. A., & Poo, M. (1998). A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature*, 395(6697), 37–44. <https://doi.org/10.1038/25665>
- Zhang, N., Li, C., Zhou, D., Ding, C., Jin, Y., Tian, Q., Meng, X., Pu, K., & Zhu, Y. (2018). Cyclic RGD functionalized liposomes encapsulating urokinase for thrombolysis. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.038>
- Zhang, R. L., Zhang, Z. G., & Chopp, M. (2008). Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology*, 55(3), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.027>
- Zhang, T.-T., Li, W., Meng, G., Wang, P., & Liao, W. (2016). Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomaterials Science*, 4(2), 219–229. <https://doi.org/10.1039/c5bm00383k>
- Zhang, Y., Lu, J., Shi, J., Lin, X., Dong, J., Zhang, S., Liu, Y., & Tong, Q. (2008). Central administration of angiotensin-(1-7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide synthase expression following focal cerebral



ischemia/reperfusion in rats. *Neuropeptides*, 42(5–6), 593–600.

<https://doi.org/10.1016/j.npep.2008.09.005>

Zhao, H., Bao, X., Wang, R., Li, G., Gao, J., Ma, S., Wei, J., Feng, M., Zhao, Y., Ma, W., Yang, Y., Li, Y., & Kong, Y. (2011). Postacute ischemia vascular endothelial growth factor transfer by transferrin-targeted liposomes attenuates ischemic brain injury after experimental stroke in rats. *Human Gene Therapy*, 22(2), 207–215.

<https://doi.org/10.1089/hum.2010.111>

Zhao, M., Chang, J., Fu, X., Liang, C., Liang, S., Yan, R., & Li, A. (2012). Nano-sized cationic polymeric magnetic liposomes significantly improves drug delivery to the brain in rats. *Journal of Drug Targeting*, 20(5), 416–421.

<https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.651726>

Zhao, M., Hu, J., Zhang, L., Zhang, L., Sun, Y., Ma, N., Chen, X., & Gao, Z. (2014). Study of amphotericin B magnetic liposomes for brain targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 475(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.035>

Zhao, Y., Jiang, Y., Lv, W., Wang, Z., Lv, L., Wang, B., Liu, X., Liu, Y., Hu, Q., Sun, W., Xu, Q., Xin, H., & Gu, Z. (2016). Dual targeted nanocarrier for brain ischemic stroke treatment. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 233, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.038>

Zhao, Y.-Z., Chen, L.-J., Lin, Q., Cai, J., Yu, W.-Z., Zhao, Y.-P., Xu, C.-Y., Mao, K.-L., Tian, F.-R., Li, W.-F., Wong, H.-L., & Lu, C.-T. (2015). Using FUS induced BBB/BTB-opening technique combined with Doxorubicin liposomes to improve glioma-targeted inhibition. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5144>

Zhao, Y.-Z., Lin, M., Lin, Q., Yang, W., Yu, X.-C., Tian, F.-R., Mao, K.-L., Yang, J.-J., Lu, C.-T., & Wong, H. L. (2016). Intranasal delivery of bFGF with nanoliposomes enhances in vivo neuroprotection and neural injury recovery in a rodent stroke model. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 224, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.017>

- Zhu, Y. Z., Chimon, G. N., Zhu, Y. C., Lu, Q., Li, B., Hu, H. Z., Yap, E. H., Lee, H. S., & Wong, P. T. (2000). Expression of angiotensin II AT2 receptor in the acute phase of stroke in rats. *Neuroreport*, *11*(6), 1191–1194. <https://doi.org/10.1097/00001756-200004270-00009>
- Zivin, J. A. (2009). Acute stroke therapy with tissue plasminogen activator (tPA) since it was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Annals of Neurology*, *66*(1), 6–10. <https://doi.org/10.1002/ana.21750>
- Zylberberg, C., & Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: A review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Delivery*, *23*(9), 3319–3329. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>