

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR PRODUZIDO PELA ALAMANDINA
EM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL**

Sthéfanie Chaves de Almeida Gonçalves

Belo Horizonte
2018

Sthéfanie Chaves de Almeida Gonçalves

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETORE PRODUZIDO PELA ALAMANDINA
EM MODELO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Maria José Campagnole-Santos

Belo Horizonte

2018

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita. ”

(Mahatma Gandhi)

*Dedico este trabalho à minha família, em especial a
minha filha, Alice.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lusimar e Wagner por todo amor, carinho e compreensão; por fazerem sempre o melhor e apoiarem as minhas decisões.

Aos meus avós João, Adelina, Elton e Carmelita, por serem os melhores avós que já existiram!

Ao Guilherme, por tanto amor, carinho, compreensão e apoio. Por me ajudar a dividir o tempo entre estudo e descontração, ser amigo, namorado, noivo e sempre acreditar no meu potencial.

A Alice, por compreender os momentos em que eu não podia dividir minha atenção, por ser essa criança tão doce, carinhosa e ao mesmo tempo engraçada.

As minhas irmãs, Karina, Kellen e Tatiana pela paciência, amizade e colaboração.

A família Rocha, em especial a Liliane.

Aos amigos que resistiram ao tempo, a distância e à minha falta de disponibilidade.

A professora Maria José, que me aceitou como sua aluna sem me conhecer, e me deu um voto de confiança. Agradeço por dividir comigo um pouco do seu conhecimento; e sempre orientar com tanta gentileza e compreensão.

Ao José Roberto, Zezé, por ter dividido comigo a sua experiência em cirurgia animal.

Ao Lucas Kangussu, que participou ativamente deste trabalho, contribuindo desde a ideia até a execução de experimentos.

A Dani Alves, também pela colaboração na execução dos experimentos, pelos conhecimentos divididos e muitas risadas na sala do confocal.

Ao professor André Ricardo Massensini pela colaboração, ideias e disponibilidade em me atender.

As alunas do laboratório de neurociências, em especial a Lorena, Beatriz e Ana Flávia, que me ensinaram a metodologia do comportamento animal.

A professora Mirian e ao Dalton, que gentilmente cederam uma alíquota de Hoechst para que a imunofluorescência deste trabalho pudesse ser realizada.

Ao Jonathas, Nádia e Gabriel, por sempre atenderem aos meus pedidos com boa vontade e bom humor.

A aluna de iniciação Lorena, que me ajudou na execução de todos os experimentos. Volto a dizer, que sem você não teria sido possível, obrigada!

A Carina, Cristiane e Silvia, por serem as primeiras pessoas a me acolher, por toda demonstração de amizade e pelos momentos de desabafo.

Aos demais amigos e professores do Laboratório de Hipertensão.

As técnicas Mônica, Alessa, Elaine e ao Sílvia, por cuidarem do bem-estar dos animais deste trabalho.

A CAPES, FAPEMIG, CNPq, NNC e INCT NanoBioFar pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é caracterizado pela redução ou interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo, o que pode resultar em morte neuronal. É uma doença prevalente, altamente incapacitante e está entre as principais causas de morte em todo o mundo. Trabalhos anteriores mostraram a participação do sistema renina-angiotensina (SRA) na fisiopatologia do AVE. A angiotensina-(1-7) é capaz de promover neuroproteção em modelo experimental de AVE devido principalmente à sua ação anti-inflamatória. A alamandina, um peptídeo formado pela descarboxilação do ácido aspártico da Ang-(1-7) ou pela hidrólise da Ang A pela enzima conversora de angiotensina 2, foi recentemente identificada como um novo mediador do SRA. Os estudos realizados até o momento mostraram que a maioria das ações da alamandina são semelhantes às da Ang-(1-7), podendo se tornar uma via alternativa importante do SRA para atenuar o desenvolvimento de doenças neurovasculares. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor da alamandina em um modelo de isquemia/ reperfusão cerebral induzida pela oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCCAO). Ratos Sprague-Dawley, machos, com 9 a 12 semanas de idade foram separados em 3 grupos experimentais: Controle (Sham, veículo; n=16), BCCAO não tratado (veículo; n=17) e BCCAO tratado com alamandina incluída em ciclodextrina (0,2 µg; n=19) por via intracerebroventricular (ICV). O tratamento foi realizado cerca de 20 min antes da oclusão das carótidas. Neste trabalho mostramos que a injeção central de alamandina produziu efeitos anti-inflamatório, com atenuação dos níveis de TNF α , IL-1 β e IL-6, e antioxidante através do aumento da atividade de SOD, Catalase e GSH em animais do grupo BCCAO. Além disso, a injeção ICV de alamandina reduziu o número de neurônios/células em apoptose no estriado e atenuou o comprometimento motor e sensorial dos animais submetidos a BCCAO. Animais com deleção do principal receptor envolvido nos efeitos da alamandina, apresentaram piora do comprometimento motor em relação a camundongos selvagens (C57/BL6). Estes resultados indicam que a alamandina apresenta efeito neuroprotetor em modelo de isquemia e reperfusão.

Palavras chaves: Alamandina, isquemia cerebral, neuroproteção, inflamação, estresse oxidativo, recuperação funcional.

ABSTRACT

Stroke is characterized by reduced or interrupted blood flow to the brain, which can result in neuronal death. It is a prevalent disease, highly disabling and it is among the leading causes of death worldwide. Previous studies have shown the involvement of the renin-angiotensin system (RAS) in the pathophysiology of stroke. Angiotensin-(1-7) is able to promote neuroprotection in an experimental model of stroke mainly due to its anti-inflammatory action. Alamandine, a peptide formed by the decarboxylation of aspartic acid from Ang-(1-7) or by the hydrolysis of Ang A by the angiotensin converting enzyme 2, has recently been identified as a new mediator of the RAS. Studies to date have shown that most of alamandine actions are similar to those of Ang-(1-7), which may become an important alternative route of the RAS to attenuate the development of neurovascular diseases. The aim of the present study was to evaluate the neuroprotective effect of alamandine in a model of cerebral ischemia/ reperfusion induced by bilateral common carotid arteries occlusion (BCCAO). Male, 9 to 12 weeks old Sprague-Dawley rats were separated into 3 experimental groups: Control untreated (Sham-vehicle, n=16), BCCAO untreated (vehicle; n=17) and BCCAO treated with alamandine included in cyclodextrin (0.2 µg; n=19). Treatment was performed by intracerebroventricular (ICV) route. The treatment was performed about 20 min before carotid occlusion. We showed that central injection of alamandine produces an anti-inflammatory effect, with the reduction of TNF α , IL-1 β and IL-6, and antioxidant effect through an increase in SOD, catalase and GSH in the brain of BCCAO rats. In keeping, alamandine reduced the number of apoptotic neurons/cells and attenuated the neurological deficit of animals subjected to BCCAO. Further, MrgD knockout mice, an animal model that lacks the main alamandine receptor, showed increase in neurological deficit. These results indicate that alamandine presents a neuroprotective effect in a model of ischemia and reperfusion.

Key-words: Alamandine, stroke, neuroprotection, inflammation, oxidative stress, functional recovery.

Sumário

RESUMO.....	v
ABREVIATURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Acidente Vascular Encefálico.....	1
1.2. Modelos Experimentais de Isquemia.....	2
1.3. Fisiopatologia do AVE.....	4
1.4. Sistema Renina-Angiotensina.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral:.....	16
2.2. Objetivos específicos:.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Drogas.....	17
3.3. Estereotaxia.....	17
3.4. Cirurgia para produção de isquemia cerebral (oclusão bilateral das artérias carótidas comuns).....	18
3.5. Avaliação do déficit neurológico.....	19
3.6. Teste de assimetria bilateral.....	21
3.7. Estresse oxidativo.....	21
3.8. Dosagem de mediadores inflamatórios.....	23
3.9. Perfusão transcárdica.....	24
3.10. Imunofluorescência.....	24
3.11. Análise Estatística.....	25
4. GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Curva de sobrevivência.....	28
5.2. Escore neurológico.....	29
5.3. Teste de assimetria bilateral.....	31
5.4. Avaliação do estresse oxidativo.....	33
5.5. Níveis de citocinas no cérebro.....	35
5.6. Avaliação de neurônios em apoptose.....	36
5.7. Avaliação do déficit neurológico em camundongos.....	39
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Classificação do acidente vascular encefálico.....	2
Figura 2. Modelos experimentais para o estudo das alterações decorrentes da isquemia cerebral.	3
Figura 3. Cascata simplificada de eventos subsequentes a isquemia cerebral decorrente de oclusão vascular.	10
Figura 4. Sequência de hidrólise do angiotensinogênio e formação dos principais peptídeos do sistema renina angiotensina.....	12
Figura 5. Vias de formação da Alamandina.....	14
Figura 6. Protocolo experimental 1.....	26
Figura 7. Protocolo experimental 2.....	26
Figura 8. Protocolo experimental 3.....	27
Figura 9. Curva de sobrevivência.	28
Figura 10. Avaliação do déficit neurológico.....	30
Figura 11. Teste de assimetria bilateral.....	32
Figura 12. Atividade de enzimas marcadoras de estresse oxidativo	34
Figura 13. Níveis de citocinas no sistema nervoso central após isquemia global transiente.....	35
Figura 14. Diagrama de corte frontal do cérebro de rato.....	36
Figura 15. Avaliação de neurônios em apoptose.....	37
Figura 16. Porcentagem de células em apoptose.....	38
Figura 17. Avaliação do déficit neurológico em camundongos.....	40
Figura 18. Cascata simplificada de eventos subsequentes a isquemia cerebral decorrente de oclusão vascular e principais mecanismos neuroprotetores da alamandina.....	45

ABREVIATURAS

A-779	Antagonista Seletivo da Ang-(1-7)
Ang	Angiotensina
AT ₁	Receptor de Angiotensina do Tipo 1
AT ₂	Receptor de Angiotensina do Tipo 2
ATP	Adenosina Trifosfato
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BAT	Teste de Assimetria Bilateral
BCCAo	Oclusão Bilateral das Artérias Carótidas
CAT	Catalase
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GCL	Glutamato Cisteína Ligase
GR	Glutationa Reduzida
GSH	Glutationa
GSHPx	Glutationa Peroxidase
GSSH	Glutationa Oxidada
ICV	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IL	Interleucina
Mas	Receptor de Angiotensina-(1-7)
MDA	Malondialdeído
MrgD	Receptor de Alamandina
NO	Óxido Nítrico
PA	Pressão Arterial
PD123319	Antagonista do Receptor AT ₂ e MrgD
PBS	Solução Tampão Fosfato

pH	Potencial Hidrogeniônico
SD	Sprague Dawley
SHR	Rato Espontaneamente Hipertenso
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
SOD	Superóxido Dismutase

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidente Vascular Encefálico

O encéfalo é um dos órgãos mais sensíveis à redução de fluxo sanguíneo, devido à alta demanda metabólica e a ausência de reservas energéticas. Por esse motivo, é necessário um fluxo sanguíneo constante para fornecer quantidades adequadas de glicose e oxigênio ao encéfalo (Zemke *et al.*, 2004). A redução ou interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo é característica do acidente vascular encefálico (AVE) e pode resultar em morte neuronal (NIH, 1995). O AVE está entre as principais causas de morte em todo o mundo, e gera um alto custo socioeconômico, especialmente em países em desenvolvimento (Carmichael, 2005; Murray e Lopez, 1997). Estima-se que 1/6 da população adulta sofrerá pelo menos um AVE em algum momento da vida (Seshadri *et al.*, 2006). No Brasil, o AVE é responsável por mais de 90 mil óbitos por ano, sendo a maior taxa da América Latina (Lipska *et al.*, 2007). Trata-se de uma doença altamente incapacitante, responsável por distúrbios motores, de deglutição, de fala e/ou de linguagem, que limitam ou incapacitam os seres humanos de exercerem atividades cotidianas (Schelp *et al.*, 2004).

Existem duas classificações para o AVE: o isquêmico e o hemorrágico, como mostrado no desenho ilustrativo da Figura 1. O AVE isquêmico que acontece devido à obstrução arterial, tem maior prevalência, entre 80 e 87%, sendo a principal causa de morbidade e incapacidade permanente em adultos (Durukan e Tatlisumak, 2007; Roger *et al.*, 2011). Como o risco de infarto encefálico aumenta com o envelhecimento e a expectativa de vida está crescendo globalmente (Durukan e Tatlisumak, 2007), torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias que visem o reparo neural e a melhora da recuperação funcional após a lesão encefálica (Carmichael, 2005). Sendo o cérebro um órgão de alta demanda energética, consome altas quantidades de glicose e oxigênio, exigindo aproximadamente 20% do consumo total de oxigênio e 20% do débito cardíaco; portanto, mesmo um curto período de isquemia pode resultar em importante dano

estrutural e funcional (Sommer, 2009). A gravidade da lesão neuronal decorrente do AVE depende da região afetada, da circulação colateral e do tempo de redução ou interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo (Hossmann, 1998; Ter Horst *et al.*, 1996).

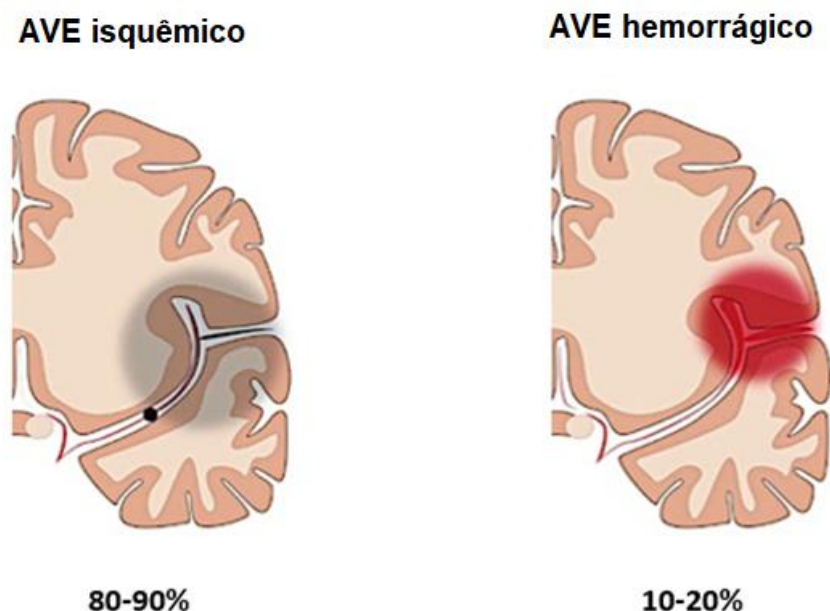


Figura 1. Classificação do acidente vascular encefálico (Modificado de Kumar, A. Brain Res. Bulletin, 2016).

1.2. Modelos Experimentais de Isquemia

A extensão do acometimento cerebral após AVE e suas consequências dependem da duração do evento isquêmico e área afetada, por isso modelos experimentais foram desenvolvidos para mimetizar o AVE humano e servir como ferramenta para estudo da patogênese e teste de novas terapias, como sintetizado na Figura 2 (Durukan e Tatlisumak, 2007). Existem dois modelos de isquemia descritos na literatura: global e focal. A isquemia global, acontece quando se promove a oclusão das artérias carótidas e/ou vertebrais. Já a isquemia focal, ocorre quando são ocluídos vasos intracranianos, geralmente a artéria cerebral média (Bogousslavsky; Van Melle e Regli, 1988). A isquemia pode ainda ser classificada em permanente ou transitória, dependendo do tempo de obstrução vascular. Na isquemia permanente não há retorno do fluxo sanguíneo aos vasos

inicialmente obstruídos; na isquemia transitória acontece a reperfusão, ou seja, há retorno do fluxo sanguíneo ao leito vascular (Ginsberg e Busto, 1989).

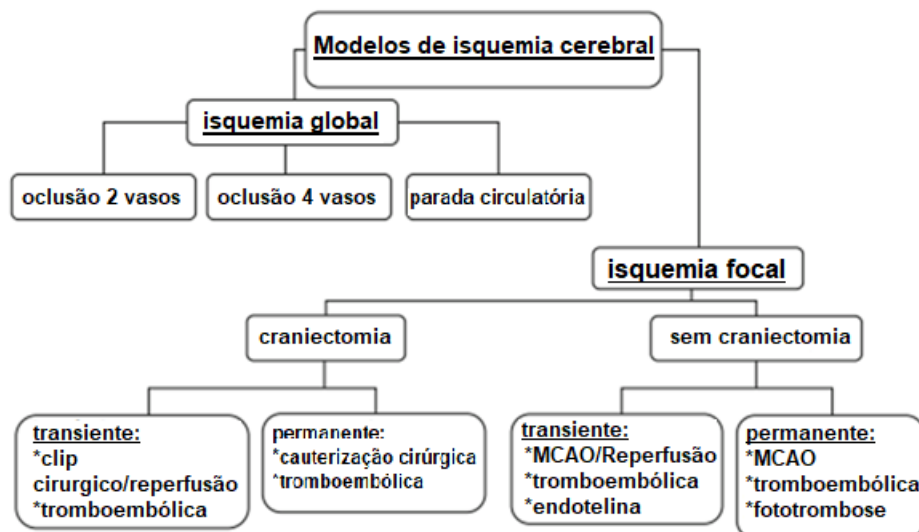


Figura 2. Modelos experimentais para o estudo das alterações decorrentes da isquemia cerebral (Modificado de Dirnagl, 2016).

É difícil instituir um modelo animal que mimetize as consequências neuropatológicas do AVE em humanos. Existem vários modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* para estudo da lesão isquêmica em animais. Um modelo simples proposto como modelo de disfunção neurológica, que tem sido amplamente utilizado, é o de oclusão bilateral da artéria carótida comum (BCCAo) (Soria *et al.*, 2013). No entanto, este modelo mostra resultados variáveis, devido as diferentes estruturas abordadas, diferentes tempos de isquemia e técnicas utilizadas (Homi *et al.*, 2002; Kakkar *et al.*, 2013; Kumar; Aakriti; Gupta, 2016). Apesar de o cérebro possuir um sistema colateral, o polígono de Willis, que é capaz de compensar alterações no suprimento sanguíneo, e fazer redistribuição de fluxo por vasos desobstruídos; a oclusão de ambas as artérias carótidas comuns excede a capacidade colateral do polígono de Willis e resulta no declínio de fluxo sanguíneo cerebral (Mitsufuji *et al.*, 1996). Após BCCAo, o fluxo sanguíneo cerebral passa por uma fase isquêmica aguda, com duração de 2 a 3 dias; que geralmente causam lesões

na substância branca, vacuolização de mielina, dano axonal, desmielinização no corpo caloso, ativação da micróglia e danos nos corpos estriados, córtex e hipocampo (Busch *et al.*, 2003; Farkas; Luiten; Bari, 2007; Jiwa; Garrard; Hainsworth, 2010; Schmidt-Kastner *et al.*, 2005). Existem muitos testes comportamentais disponíveis para modelos de AVE em roedores, mas nenhum teste é capaz de caracterizar completamente todos os déficits que ocorrem após a isquemia. Existem testes para avaliar danos agudos e crônicos em modelos de roedores, que são sensíveis à avaliação de lesões associadas a áreas específicas (Schaar; Brenneman e Savitz, 2010). Chen *et al.*, 2005 propôs uma escala de pontuação de gravidade neurológica modificada, para avaliar respostas motoras, sensoriais, reflexas e de equilíbrio, afim de determinar a gravidade da lesão. Outro teste frequentemente utilizado para avaliar a função somatossensorial é o teste de assimetria bilateral (BAT); porém requer a familiarização dos animais antes da produção de isquemia (Schallert *et al.*, 1982).

1.3. Fisiopatologia do AVE

Os principais mecanismos envolvidos na morte neuronal após a isquemia incluem a falha energética, excitotoxicidade, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), sinalização apoptótica e processos inflamatórios (Lo; Dalkara e Moskowitz, 2003). Em resposta a isquemia, a liberação de glutamato na fenda sináptica aumenta, enquanto a recaptação diminui. O excesso de glutamato, somado à variedade de receptores inotrópicos de glutamato, permite o efluxo de potássio e influxo de sódio e cálcio na célula. A entrada de íons sódio causa conseqüentemente o influxo de água para a célula, levando ao edema (Caplan; Hier e D'cruz, 1983; Zemke *et al.*, 2004).

A deficiência de oxigênio durante a isquemia incapacita a fosforilação oxidativa mitocondrial e dá início ao mecanismo anaeróbico de fermentação de lactato, que leva ao acúmulo de ácido láctico à níveis tóxicos (Caplan; Hier e D'cruz, 1983). Além disso, baixas concentrações de oxigênio também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), que

reagem com componentes celulares alterando suas propriedades físico-químicas e funções, resultando em lesão tecidual, perda da capacidade de controlar o fluxo de íons, destruição de proteínas, lipídeos, sinalização celular e danos ao DNA (Broughton; Reutens; Sobey, 2009; Zemke *et al.*, 2004).

A isquemia por si só produz morte no tecido, porém em algumas situações clínicas, uma parte substancial da lesão pode ser mais propriamente denominada lesão de reperfusão ou lesão pós-isquêmica. Grande parte da lesão pode ocorrer não durante o período de hipóxia, mas durante o período em que o oxigênio é reintroduzido no tecido (Joe M. Mccord, 1985). EROs ou radicais livres podem ser abundantemente produzidos em tecidos isquêmicos, e o desequilíbrio entre a produção de EROS e mecanismos antioxidantes resulta em uma condição conhecida como estresse oxidativo, que contribui para a progressão da lesão neuronal (Dirnagl, 2016; Joe M. Mccord, 1985).

A produção de EROs sob baixas concentrações de oxigênio causa danos a organelas e à membrana plasmática, resultando na incapacidade da célula controlar o fluxo iônico, levando à falha mitocondrial (Zemke *et al.*, 2004). Assim o dano oxidativo à macromoléculas celulares como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos contribui para a degeneração e morte neuronal (Sugawara *et al.*, 2002). A avaliação do estresse oxidativo depende da habilidade de aferição de espécies reativas, que podem ser medidas diretamente, por meio de sua concentração em fluidos biológicos e tecidos, ou indiretamente, mediante a avaliação do dano que causam ou da atividade antioxidante (Chan, 1996). Existem vários mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que atuam na proteção contra o acúmulo de EROs, assim, quando o estresse oxidativo ocorre como consequência de um evento patológico, um sistema de defesa promove a regulação e a expressão dessas enzimas (Alexandrova E Bochev, 2005).

A defesa enzimática envolve a ação de três principais enzimas antioxidantes intracelulares: superóxido dismutase (SOD), glutationala peroxidase (GSHPx) e catalase (CAT). As superóxido dismutases, são enzimas protetoras que eliminam o radical

superóxido, catalisando a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. É uma defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio, e pode ser encontrada nas mitocôndrias (Mn-SOD) e no citosol (Cu/Zn-SOD) (Fridovich, 1983). A CAT tem atividade dependente de NADPH e atua fazendo detoxificação através da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em oxigênio e água pela reação $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. O peróxido de hidrogênio é um metabólito altamente deletério, tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana das hemácias e com proteínas ligadas ao Fe^{2+} (Ferreira, A. L. A.; Matsubara, 1997). A CAT pode ser encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. (Ferreira, A. L. A.; Matsubara, 1997).

Para equilibrar a ação do estresse oxidativo, o tecido nervoso conta também com a glutathiona (GSH). A GSH é um tripeptídeo linear de aminoácidos (glutamato, cisteína e glicina). Sua síntese é realizada em duas etapas pelas enzimas glutamato cisteína ligase (GCL) e glutathiona sintetase, respectivamente (Steullet *et al.*, 2008). Glutathiona redutase (GR) é a enzima necessária para manter a glutathiona em sua forma reduzida, convertendo a GSSH (forma oxidada da glutathiona) em GSH (forma antioxidante) (Vasconcelos *et al.* 2007). A GSH participa da decomposição do peróxido de hidrogênio em água; esta reação é catalisada pela GSHPx, e a glutathiona oxidada resultante dessa reação, é reciclada pela glutathiona redutase e NADPH, mantendo níveis de GSH suficientes para prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (Stamler E Slivka, 1996). Níveis mais baixos de GSH predisõem as células aos efeitos deletérios do estresse oxidativo, além disso, estão presentes em doenças neurodegenerativas e também no processo normal de envelhecimento (Jones *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2004).

Outra consequência do estresse oxidativo é aumento da peroxidação lipídica. Um dos indicadores de aumento da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA). A lipoperoxidação caracteriza-se por aumento na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e MDA em consequência do ataque das EROs; geralmente em

situações de estresse oxidativo (D. Yuè Cel *et al.*, 2002). De maneira geral, em resposta à constante exposição ao estresse oxidativo, o sistema antioxidante reage inicialmente com um decréscimo das enzimas viáveis, seguido por elevação destas enzimas devido à mobilização dos estoques em outros órgãos, e também ao aumento na produção.

A isquemia cerebral inicia uma cascata complexa de eventos metabólicos que envolvem a geração de radicais livres de oxigênio e nitrogênio. Os lipídios da membrana cerebral são especialmente vulneráveis a danos por oxigênio reativo ou espécies de nitrogênio, e a interação destes radicais livres com a membrana celular resulta em dano proteico (D. YUÈ CEL *et al.*, 2002). Conseqüentemente, o aumento das concentrações de TBARS e peroxidação lipídica podem contribuir para o dano celular no acidente vascular cerebral isquêmico. Níveis de EROs mais elevados induzem o consumo da forma reduzida de glutatona, bem como, maior peroxidação lipídica. A isquemia por um pequeno período, como por exemplo 20 minutos, é capaz de induzir um dano cerebral evidenciado pela redução de adenosina trifosfato (ATP) e fosfocreatina, associado ao aumento de adenosina (um indicador de isquemia tecidual) no córtex e hipocampo (PLASCHKE *et al.*, 2001). Além disso, influxo de cálcio e a liberação de EROs induzem aumento de permeabilidade mitocondrial, que pode levar à liberação de citocromo C no citoplasma e inativar inibidores de caspases (Broughton; Reutens; Sobey, 2009; Zemke *et al.*, 2004). A liberação de EROs, no modelo de isquemia e reperfusão, leva ao dano celular direto, mas também pode desencadear a ativação das vias imunes periféricas (leucócitos) e residenciais do cérebro (micróglia), que estimulam a produção de mediadores imunológicos e mais liberação de EROs, criando um ciclo vicioso no AVE (Chan, 1996).

A resposta inflamatória pós-AVE consiste na ativação de células gliais, em particular, a micróglia, e a infiltração de leucócitos periféricos. A ativação da micróglia induz a liberação de moléculas pró-inflamatórias, como citocinas, quimiocinas, óxido nítrico (NO), EROs, MMP-9, glutamato e ATP (Aloisi, 2001; Davalos *et al.*, 2005; Del Zoppo *et al.*, 2007; Jin; Yang; Li, 2010; Pun; Lu; Moochhala, 2009; Selenica *et al.*, 2013).

Micróglia/macrófagos ativados podem ser classificados em duas subpopulações: M1 e M2, sendo a primeira pró-inflamatória e a última anti-inflamatória. Inicialmente, a micróglia se apresenta com o fenótipo M1 e produz citocinas, EROs e espécies de nitrogênio reativo (Cherry; Olschowka; O'banion, 2014; Perego; Fumagalli; De Simoni, 2013). Existem poucos leucócitos periféricos em cérebros íntegros, mas após uma isquemia, as células endoteliais da microvasculatura cerebral são ativadas e a infiltração de leucócitos acontece algumas horas depois (Streit, 2002; Yilmaz; Granger, 2008). Os leucócitos contribuem para a piora do dano cerebral através de mecanismos similares aos da micróglia ativada (Dantongary H; W. Dalton Dietrich, 2003; Lalancette-Hebert *et al.*, 2007) e resultam em agregação plaquetária através da ativação da cascata de ácido araquidônico (leucotrienos, tromboxano e prostaglandinas) (Gros; Ollivier; Ho-Tin-Noã, 2015).

A micróglia M1 gera citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para o agravamento da lesão cerebral (Perego; Fumagalli; De Simoni, 2013). As citocinas descritas como sendo geradas pela resposta M1 são IL-1, IL-6 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α . Por outro lado, as citocinas da micróglia que assume do fenótipo M2 parecem contribuir com um efeito protetor ou benéfico, inibindo a inflamação e promovendo o reparo do tecido (Cherry; Olschowka; O'banion, 2014; Michael Stein *et al.*, 1992). As citocinas anti-inflamatórias mais estudadas no AVE são IL-4, IL-10, IL-23 e TGF- β 1 (Cherry; Olschowka; O'banion, 2014; Michael Stein *et al.*, 1992; Perego; Fumagalli; De Simoni, 2013).

A IL-1 é constituída por duas isoformas IL-1 α e IL-1 β , que são as principais contribuintes da inflamação aguda no AVE isquêmico (Cherry; Olschowka; O'banion, 2014). Estas duas isoformas aumentam nas primeiras horas de AVE isquêmico agudo e se ligam aos receptores correspondentes (IL-1R1 e IL-1R2) (Bonaventura *et al.*, 2016; Masahito Kawabori; Midori A. Yenari, 2015). O mRNA e a proteína IL-1 β podem ser detectados em 1 a 6 horas após isquemia (Haqqani *et al.*, 2005). A interleucina 1 β contribui mais para a patologia isquêmica do que a IL-1 α (H. Boutin *et al.*, 2001). Visto que a

administração de IL-1 β leva à ampliação do tamanho da área isquemiada (Yamasaki *et al.*, 1995), enquanto a ausência de IL-1 β demonstra reduzir o tamanho da lesão isquêmica (H. Boutin *et al.*, 2001). Outra interleucina que também aumenta pouco tempo após AVE, é a IL-6. As concentrações aumentam inicialmente 3 horas após a injúria, atingem o pico às 12 horas e permanecem elevadas 24 horas após o início da isquemia cerebral. A IL-6 foi detectada no plasma e líquido cefalorraquidiano de pacientes com AVE, e em modelo animal de AVE isquêmico, foi detectada IL-6 em micróglia e neurônios corticais (Lambertsen; Biber; Finsen, 2012).

O TNF- α também foi detectado na isquemia cerebral e aparece em grande parte na micróglia 30 minutos após o AVE experimental (Lambertsen; Biber; Finsen, 2012). Expressão que também pode ser encontrada em neurônios e astrócitos. Porém as ações do TNF- α são controversas. A administração de anticorpos neutralizantes ao TNF- α apresentou um efeito protetor contra a lesão isquêmica no modelo oclusão da artéria cerebral média (Yang, G. *et al.*, 1997). Em contraste, Bruce Aj *et al.*, 1996 relataram que a lesão cerebral isquêmica foi aumentada em camundongos geneticamente deficientes no receptor de TNF. A discrepância destes resultados pode ser explicada pelo fato de TNF possuir dois tipos de receptores de superfície (TNFR1 e TNFR2) (Parameswaran; Patial, 2010). TNF- α existe em formas transmembranares e solúveis. TNF- α solúvel se liga ao TNFR1 levando a efeitos neurotóxicos, enquanto o TNF- α ligado à membrana se liga ao TNFR2 levando a efeitos neuroprotetores (LAI; TODD, 2006). Para confundir mais as coisas, parece que os efeitos do TNF- α no estriado são neurodegenerativos, enquanto no hipocampo são neuroprotetores (Sriram; O'callaghan, 2007).

A IL-10 é uma citocina com ação anti-inflamatória produzida principalmente por micróglia, macrófagos e astrócitos, e apresenta efeito neuroprotetor, reduzindo a inflamação e melhorando déficits neurológicos após a lesão isquêmica (Cherry; Olschowka; O'banion, 2014; Ren *et al.*, 2011; Rotshenker, 2009). A IL-10 também atua

inibindo citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , além de suprimir a expressão e ativação de receptores destas citocinas (Rotshenker, 2009).

Em síntese, a liberação de EROs, assim como o processo inflamatório decorrente da isquemia-reperusão, aumentam a região infartada e atrasam a recuperação da função neural (Amadatsu *et al.*, 2016; Chamorro; Hallenbeck, 2006). Estes fatores levam a perda da homeostase celular, determinando morte neuronal após a isquemia (Zemke *et al.*, 2004). Além do estresse oxidativo e da inflamação, a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) também contribui para a patogênese do AVE (Bennion *et al.*, 2015; Summers *et al.*, 2013). Em síntese, os principais mecanismos envolvidos na patogênese do AVE são: a falha energética, excitotoxicidade, formação de ERO's, processos inflamatórios e sinalização apoptótica, como mostrado na Figura 3. A neuroproteção compreende qualquer intervenção farmacológica ou não, que altere os mecanismos intracelulares da cascata isquêmica (Freitas *et al.*, 2005).

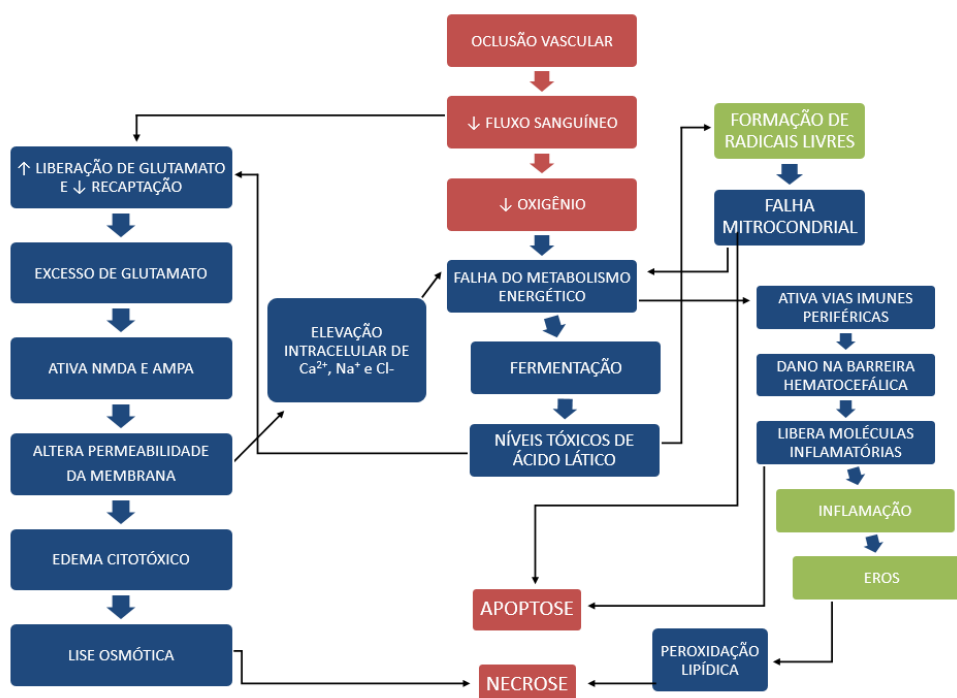


Figura 3. Cascata simplificada de eventos subsequentes a isquemia cerebral decorrente de oclusão vascular (Adaptado de Durukan, 2007).

1.4. Sistema Renina-Angiotensina

O SRA é fundamental para o controle da pressão arterial (PA) e balanço hidroeletrólítico (Hall, 1991). O principal produto deste sistema é o octapeptídeo angiotensina II (Ang II), que também está envolvido na fisiopatologia das doenças cardiovasculares e nos processos que ocasionam lesões no sistema nervoso central (SNC) após isquemia cerebral (Saavedra, 2005). O eixo clássico do SRA é representado pela enzima conversora de angiotensina, Ang II e receptor AT₁. Estudos mostraram que o bloqueio farmacológico do receptor do subtipo AT₁ diminui o tamanho da lesão isquêmica cerebral e déficits neurológicos em modelos animais de isquemia cerebral (Groth *et al.*, 2003), demonstrando o envolvimento deste receptor e do seu agonista, a Ang II, na patogênese da morte celular causada por isquemia cerebral. Em contraste, outro eixo funcional do SRA, representado pelas ações da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), Ang-(1-7) e receptor Mas, tem sido amplamente reconhecido como um eixo contra-regulatório do eixo ECA/Ang II/ receptor AT₁ (Guimaraes *et al.*, 2014; Qaradakhi; *et al.*, 2016). A Figura 4 apresenta a cascata bioquímica da formação dos principais peptídeos do SRA.

O heptapeptídeo, Ang-(1-7), é predominantemente formado através da ação da ECA2 e tem seus efeitos fisiológicos mediados pelo receptor Mas, um receptor acoplado a proteína G, identificado como sítio de ligação para Ang-(1-7) (SANTOS *et al.*, 2003). Até o momento, os efeitos apresentados pela Ang-(1-7) incluem ações anti- inflamatória, anti-fibrótica, anti-hipertensiva, anti-proliferativa, anti-arritmogênica, anti-angiogênica, antitrombótica, antioxidante e vasodilatadora, além de apresentar efeito na memória e aprendizado (Ferreira, A. J.; Santos; Almeida, 2001; Hellner *et al.*, 2005; Lautner *et al.*, 2013; Lazaroni *Et Al.*, 2012; Yang, R.-F. *et al.*, 2011). Assim o eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ Mas apresenta ações opostas às da Ang II (Arroja; Reid; McCabe, 2016) e induz efeitos benéficos contra danos no SNC produzidos por isquemia.

A Ang-(1-7) gerada endogenamente pela ativação da ECA2 ou sua administração direta no SNC induziu efeitos protetores mediados pelo receptor Mas durante o AVE produzido por isquemia da artéria cerebral média (MECCA *et al.*, 2011). Este resultado foi corroborado por outros estudos que demonstraram que os efeitos neuroprotetores da Ang-(1-7) decorrem do aumento da sobrevivência neuronal, melhoram aspectos comportamentais e neurológicos em ratos espontaneamente hipertensos propensos a AVE (SHR-sp) (Arroja; Reid; McCabe, 2016; Bennion *et al.*, 2015; Regenhardt *et al.*, 2013, 2014; Sumners *et al.*, 2013; Zheng, J.-L. *et al.*, 2014). Este efeito parece estar relacionado à ações anti-inflamatórias da Ang-(1-7) (Regenhardt *et al.*, 2013). Fernandes *et al.* (2017) mostraram também que lipossomas contendo Ang-(1-7) atravessam a barreira hematoencefálica e apresentam elevado potencial para o tratamento do AVE após modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAo).

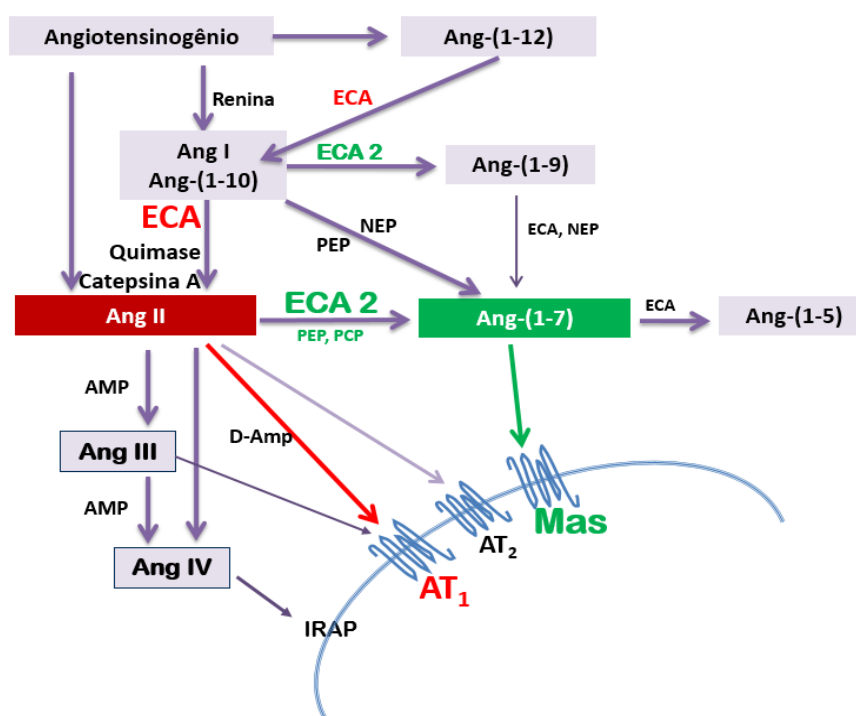


Figura 4. Sequência de hidrólise do angiotensinogênio e formação dos principais peptídeos do sistema renina-angiotensina. AMP- aminopeptidase; Ang- angiotensina; D-AMP- dipeptidil-aminopeptidase; ECA- enzima conversora de angiotensina; IRAP- aminopeptidase regulada pela insulina; NEP- endopeptidase neutra; PCP- prolil-carboxipeptidase; PEP – prolilendopeptidase.

Nos últimos anos, novos peptídeos, receptores e enzimas foram descobertos e adicionaram maior complexidade ao SRA. Recentemente, foi identificada a Angiotensina A (Ang A), como um peptídeo do SRA derivado da Ang II, formado pela descarboxilação enzimática do primeiro aminoácido, o ácido aspártico, que se transforma em alanina. A Ang A possui afinidade semelhante à de Ang II pelo receptor AT₁, porém com menor potência para induzir vasoconstrição. No entanto, a afinidade de Ang A para o receptor AT₂ é maior que a de Ang II (Jankowski *et al.*, 2006). A partir da Ang A foi identificado outro peptídeo do SRA, produto de hidrólise catalítica mediada por ECA2, a alamandina (Lautner *et al.*, 2013).

A alamandina é um peptídeo endógeno presente no plasma humano, que além de poder ser formado a partir da Ang A, também pode ser formado a partir da Ang-(1-7) através da descarboxilação do ácido aspártico (diferindo apenas pela presença da alanina no lugar do aspartato) (Lautner *et al.*, 2013), como mostrado na Figura 5. Os efeitos biológicos descritos para a alamandina até o momento se assemelham aos da Ang-(1-7) (Lautner *et al.*, 2013). Na caracterização dos efeitos biológicos da alamandina foi mostrado que as suas ações eram mantidas em camundongos com deficiência de receptores Mas, indicando que os efeitos da alamandina não dependiam deste receptor (Lautner *et al.*, 2013). Na verdade, estudos anteriores já haviam mostrado que alguns efeitos da Ang-(1-7) não eram inibidos pelo antagonista do receptor Mas, A-779, mas eram atenuados por outro antagonista, o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (Herath *et al.*, 2013; Lemos *et al.*, 2002). No estudo de Lautner *et al.*, (2013) verificou-se que o D-Pro⁷-Ang-(1-7) antagonizava ações da alamandina em outro receptor da família do Mas, o receptor acoplado a proteína G relacionado ao Mas do tipo D (MrgD) (Gembardt *et al.*, 2008, Lautner *et al.*, 2013; Villela; Passos-Silva; Santos, 2014).

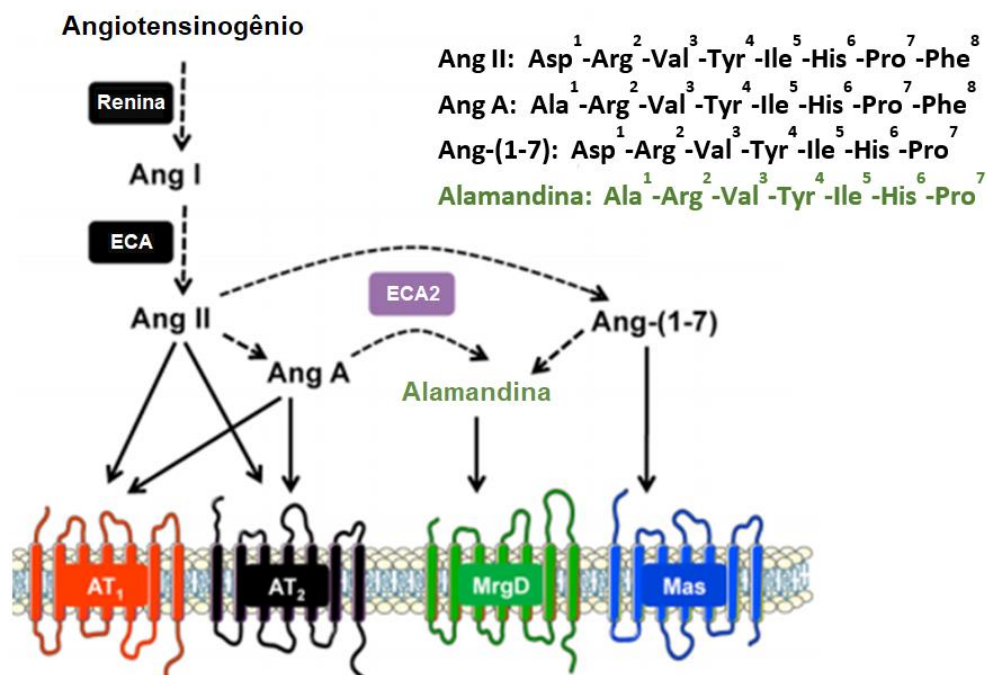


Figura 5. Vias de formação da Alamandina, sequência de amino ácidos dos principais peptídeos, e receptores angiotensinérgicos (Adaptado de Lautner *et al.*, 2013). ECA- ; AT- receptor angiotensinérgico; Mas- receptor da angiotensina-(1-7); MrgD- receptor da alamandina

Oliveira *et al.*, (2016), mostraram que o receptor MrgD está expresso em diferentes tecidos e órgãos, como no SNC, coração, pulmão, vasos sanguíneos, tecido adiposo perivascular, testículo, adrenal e em células sanguíneas. No SNC, o receptor MrgD foi identificado pela técnica de imunofluorescência no córtex insular, amígdala, núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo reuniens do hipotálamo, hipotálamo dorsomedial, hipocampo, substância cinzenta periaquedutal, rafe pallidus, área caudoventrolateral do bulbo, no núcleo facial, núcleo olivar superior, no córtex somatossensorial primário e no córtex somatossensorial secundário.

Até o presente momento, os efeitos cardiovasculares identificados para a alamandina incluem a vasodilatação dependente de endotélio em anéis de aorta de ratos e camundongos, e alteração da PA após injeção em áreas bulbares relacionadas ao controle do sistema nervoso autônomo (Lautner *et al.*, 2013). Além disso, em um estudo

não publicado do nosso laboratório, a alamandina apresentou efeito cardioprotetor e anti-arritmogênico, em coração isolado de ratos hipertensos, que parecem ocorrer via receptor MrgD uma vez que em camundongos com deleção genética deste receptor foi observado prejuízo da função cardíaca (Almeida, *et al.*, 2017).

Em modelo animal de asma alérgica, a administração oral de (alamandina / HP β CD) atenuou a expressão de IL-13 sem alterar os níveis aumentados de IL-5, induziu uma tendência de aumento dos níveis de IL-10 e atenuou a liberação de quimiocinas no pulmão. (Gregório; *et al.*, 2017). A alamandina também apresenta efeito sobre o remodelamento vascular, em modelo de coarctação da aorta torácica, induzindo efeito anti-fibrótico e anti-inflamatório, diminuindo a expressão genica de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1 β). Além disso, a alamandina também aumentou a expressão gênica do receptor MrgD e reduziu o aumento da expressão gênica do receptor AT1 induzido pela coarctação da aorta torácica (De Souza-Neto *et al.*, 2017). No entanto, a alamandina e a Ang-(1-7) não se restringem a cópias que desempenham apenas efeitos semelhantes, estudos recentes mostraram que: (i) a alamandina não apresentou efeitos anti-proliferativos em dois tipos de células tumorais humanas (Lautner *et al.*, 2013); (ii) a microinjeção de alamandina no córtex insular produziu aumento da pressão arterial, que não foi observado pela microinjeção de Ang-(1-7) na mesma região do cérebro (Marins *et al.*, 2014); (iii) alamandina apresenta efeitos vasoativos distintos da Ang-(1-7) na vasculatura de coelhos submetidos à uma dieta aterogênica (Habiyakare *et al.*, 2014). Além dos efeitos relatados acima, as vias de ação dos receptores, Mas e MrgD nas células endoteliais são diferentes. Uma vez ativado o receptor Mas, ocorre liberação de NO e redução na produção de superóxido (Sampaio *et al.*, 2007), enquanto que o receptor MrgD age via proteína quinase A (PKA) (Qaradakhi *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar o efeito da injeção intracerebroventricular (ICV) de alamandina em um modelo de isquemia/ reperfusão cerebral induzida por BCCAO.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar as alterações motoras e sensoriais produzidas por BCCAO em ratos tratados com alamandina.
- Avaliar mecanismos centrais, especificamente estresse oxidativo e mediadores inflamatórios, envolvidos no efeito da alamandina em ratos submetidos a BCCAO.
- Avaliar a morte neuronal em ratos submetidos à BCCAO.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley (SD), com idade de 9 a 12 semanas, e camundongos C57BL/6J e MrgD KO, com idade de 10 a 13 semanas, fornecidos pelo biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em estante ventilada, ciclo claro-escuro 12/12 horas, com livre acesso a água e comida (ração Nuvilab para roedores). Os protocolos realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) sob o protocolo nº 379/2017.

3.2. Drogas

- Alamandina: Ala-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro; RS Synthesis, EUA
- 2-hidroxipropil- β - ciclodextrina, 2HP β CD; Xiamen Mchem Pharma LTD, EUA
- 2,2,2 - Tribromoetanol; Sigma-Aldrich Chemistry, EUA
- Cloridrato de lidocaína com 2% de epinefrina; Cristália, Brasil.
- Pentabiótico veterinário; Zoetis, EUA.
- Tramadol; Vitalis, Brasil.

3.3. Estereotaxia no rato

Para a injeção de alamandina ou de veículo no ventrículo lateral (ICV), os animais eram anestesiados por via intraperitoneal com tribromoetanol 250mg/kg de peso corporal. Em seguida, cada animal era submetido à tricotomia da região dorsal da cabeça e posicionados no aparelho estereotático (Stoelting,EUA), fixados por barras auriculares de forma que a cabeça ficava em posição horizontal em relação as barras laterais do estereotático. Após assepsia com álcool iodado, era feita uma anestesia local subcutânea com cloridrato de lidocaína 2% contendo epinefrina 1:200.000 com o objetivo de analgesia

e redução de sangramento. Era feita uma incisão mediana na pele para permitir a visualização do bregma (ponto de referência para parâmetros anteroposterior, latero-lateral e dorsoventral). Com uma broca odontológica (Fresa de Carbuco; Angelus Prima, BRA) era feita a trepanação do crânio formando um orifício a partir das coordenadas 1,0mm posterior, 1,5mm lateral do bregma, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2002).

Uma cânula guia (18G) 28,1mm de comprimento era posicionado à 4,2mm de profundidade a partir do osso. Dentro dessa cânula, havia uma cânula metálica (25G), injetora 0,3 mm mais longa, que era conectada a uma seringa Hamilton de 10 μ L para a injeção no ventrículo lateral. As injeções eram feitas em um período de aproximadamente 3 minutos. Após a injeção as cânulas eram removidas e a pele suturada com fio agulhado nylon estéril 5/0. Pentabiótico veterinário (1.200.000 UI; 0,15ml) era administrado por via intramuscular, 30 minutos antes da cirurgia, como medida profilática a possíveis infecções no tecido neural decorrentes da cirurgia e Tramadol (10 mg/kg via intramuscular) era injetado para analgesia após os procedimentos cirúrgicos.

3.4. Cirurgia para produção de isquemia cerebral (oclusão bilateral das artérias carótidas comuns)

Ao final da injeção ICV, os animais eram submetidos à cirurgia para produção do modelo de AVE por meio da oclusão transitória das artérias carótidas comuns. Para este fim, era feita uma incisão sagital mediana ventral na pele do pescoço do animal e os tecidos eram divulsionados até que as artérias carótidas comuns, fossem expostas e cuidadosamente separadas do nervo vago e nervos adjacentes com o auxílio de duas pinças oftálmicas de ponta curva. As artérias carótidas comuns eram ocluídas temporariamente com micro clips cirúrgicos aplicados em ambas as artérias isoladamente, a fim de bloquear o fluxo sanguíneo cerebral durante 25 minutos. Após

remoção dos cliques, a incisão na pele era suturada. Os animais Sham eram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, excluindo-se efetiva oclusão das artérias. Ao final da cirurgia, os animais eram mantidos aquecidos para a manutenção da temperatura corporal durante a recuperação da anestesia. Aproximadamente 24 horas após os procedimentos cirúrgicos, os animais eram submetidos a primeira fase de testes comportamentais e, cerca de 72 horas após as cirurgias, os animais eram submetidos à segunda fase de testes comportamentais e eutanásia. Os camundongos eram submetidos somente à cirurgia para a produção de isquemia, descrita acima.

3.5. Avaliação do déficit neurológico

A avaliação do déficit neurológico foi realizada aproximadamente nos tempos de 24 e 72 horas após a oclusão das artérias carótidas comuns. Foi utilizada uma escala adaptada do estudo de Chen *et al.* (2005), que atribuiu pontuação de 0 a 14 de acordo com a Tabela 1. Nesta escala quanto maior a pontuação, ou seja, próximo a 14, maior o déficit neurológico do animal. Esta avaliação foi realizada por um experimentador que desconhecia os procedimentos que cada animal havia sido submetido (cego).

Tabela 1. Descrição dos parâmetros pontuados para a avaliação do déficit neurológico em uma escala de 14 pontos, onde 0 representa um animal sem comprometimento neurológico e 14 pontos o máximo de comprometimento. Adaptado de Chen *et al.*, (2005).

1) SUSPENSÃO PELA CAUDA	Ausência de flexão dos membros anteriores	
	Ausência de flexão dos membros posteriores	
	Inclinar a cabeça verticalmente em um ângulo de até aproximadamente 10° em até 30 seg	
2) COLOCAR ANIMAL SOBRE UMA SUPERFÍCIE	Incapacidade de andar em linha reta	
	Apresentar movimentos circulares	
	Tombar para o lado	
3) TESTES DE EQUILÍBRIO NA BARRA	Segurar a barra de lado	
	Abraçar a barra e uma das patas anteriores se soltar (até 30 seg)	
	Abraçar a barra e as duas patas anteriores se soltarem, ou girar na barra (até 30 seg)	
	Cair da barra após tentativa de se equilibrar (em até 20 seg)	
	Cair da barra após tentativa de se equilibrar (em até 10 seg)	
	Cair da barra, sem tentativa de se equilibrar ou de se segurar nela	
4) AUSÊNCIA DE REFLEXOS	"Pinna reflex" (balançar a cabeça ao ser tocado no pavilhão auditivo)	
	Reflexo córneo-palpebral (piscar quando um algodão toca a córnea ligeiramente)	
	SOMA	14

3.6. Teste de assimetria bilateral

O teste de assimetria bilateral é utilizado frequentemente como teste da função motora e somatossensorial. Consiste em colocar fitas colantes (fita crepe) de tamanho padronizado 0,5cm x 5 cm nas patas anteriores do animal, e avaliar: (i) o tempo para percepção da fita, que se traduz no primeiro contato da fita com a boca do animal ou o chacoalhar das patas, e (ii) a latência de remoção da fita de cada pata separadamente. Aproximadamente 2 a 3 dias antes das cirurgias os animais eram submetidos a familiarização do teste e, 72 horas após a cirurgia, o teste era repetido para avaliação das funções motora e somatossensorial, de acordo com Komotar *et al.*, (2007)

Após os testes comportamentais, os animais eram eutanasiados e os cérebros coletados para análises posteriores. Para as dosagens de estresse oxidativo e mediadores inflamatórios, os encéfalos foram divididos em dois hemisférios, e um dos hemisférios foi utilizado para as dosagens de citocinas e o outro para as dosagens de mecanismos antioxidantes.

3.7. Estresse oxidativo

Para a avaliação do estresse oxidativo, foram realizados testes enzimáticos colorimétricos para medir a atividade de enzimas antioxidantes 72 horas após a indução de isquemia. Os tecidos foram homogeneizados individualmente em uma solução contendo PBS (0.1 M, pH 7.2) e tampão Tris/HCl (5mmol/L; pH 7,5) na mesma proporção (foi utilizado 1 ml dessa solução para cada amostra). O volume final deste homegenato foi dividido em 4 partes de aproximadamente 250 µL, que foram distribuídas para a avaliação da atividade da SOD, catalase e GSH; e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para determinar a concentração de proteína nas amostras, utilizamos o método Bradford (1976). A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para quantificar as concentrações de proteína nas amostras, foi

realizada uma curva padrão para albumina bovina (foram utilizados de 0,5 a 10 µg de BSA).

Para a determinar a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), em uma das alíquotas do homogenato, foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de sódio (50 mmol/L, pH 7,8) contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA). A reação foi iniciada após a adição de pirogalol (0,2 mmol/L). A leitura realizada em uma microplaca Sunrise Remote (Tecan Deutschland GMBH, Alemanha), no espectrofotômetro a 420 nm. A concentração da enzima que inibiu a reação em 50% (IC50) foi definida como uma unidade de SOD expressa por mg de proteína total (Unidades de SOD / por mg de proteína; (Gao *et al.*, 1998).

O protocolo experimental para determinação da atividade da catalase foi realizado conforme descrito pelo método de NELSON e KIESOW (1972). Foi adicionado peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L), ao homogenato, e a decomposição de peróxido foi mensurada no espectrofotômetro a 240 nm. O consumo de peróxido foi acompanhado por uma diminuição da absorvância durante 1 min e a catalase foi definida como a quantidade de enzima que conseguiu decompor um mol de peróxido (expresso em nmol / min / mg de proteína).

Para a determinar a atividade da glutathiona peroxidase, (GSH-Px) foi seguido o protocolo descrito por SEDLAK e LINDSAY (1968). Para 40 µL do homogenato reservado para a dosagem de GSH, foi adicionado 1300 µL de água destilada, 200 µL de tampão Tris/HCl, 200 µL de 10 U/mL de glutathiona redutase (GSH-Rd), 200 µL de NADPH (2,0 mmol/L) e 40 µL de glutathiona (0,1mol/L). Em seguida, foi adicionado 20 µL de T-butil hidroperóxido (7 mmol/L) e a mistura foi mantida a 37°C durante 10 minutos. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína (U/mg proteína).

Para determinar os níveis de TBARS, a taxa de peroxidação lipídica foi determinada pela reação entre o ácido tiobarbitúrico e malondialdeído (MDA), utilizando a técnica de ohkawa; Ohishi e Yagi (1979). Foram adicionados ao homogenato 8,1% (p/v) de duodecil sulfato de sódio (SDS), 2,5 mol/L de ácido acético (pH 3,4), 0,8% de ácido tiobarbitúrico. Esta mistura foi incubada durante 60 minutos a 95°C; e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. O teor de proteínas totais do tecido foi determinado utilizando BSA, como descrito anteriormente. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de MDA/mg proteína.

3.8. Dosagem de mediadores inflamatórios

O cérebro de ratos de todos os grupos, foram coletados 72 horas após a isquemia, e armazenados em freezer -80°C. No dia da dosagem, o cérebro foi homogeneizado em solução de extração (100mg de tecido para cada 1 mL de solução) contendo 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween™ 20, 0,5% de albumina de soro bovino (BSA), 0,1 mmol / L de fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mmol / L de cloreto de benzetônio, 10 mmol / L ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 20 UI de aprotinina. O homogenato foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos, na temperatura de 4°C, e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20° (Eva Engvall e Erkki Ruoslah, 1977). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (0,01 M, pH 7.4), e a sensibilização da placa ocorreu durante 18 horas à 4°C. O conteúdo foi retirado da placa, e a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem (PBS 0,01 M contendo 1000 µl de tween 0,05%). Ao fim das lavagens foi adicionado tampão de bloqueio (BSA) 1% durante 2 horas. As placas foram incubadas a 4°C “overnight”; e o anticorpo de detecção foi adicionado. As citocinas IL-6, IL-10, IL-1β e TNFα foram dosadas pelo ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay – ELISA sanduíche), utilizando anticorpos comercialmente disponíveis e foram seguidos os

procedimentos indicados pelo fabricante (R&D Systems: Products & Services for Cell Biology Research; EUA).

3.9. Perfusão transcardíaca

Os animais foram pesados e anestesiados por injeção i.p. com tribromoetanol 250mg/kg. Em seguida foram colocados em decúbito dorsal, e a caixa torácica foi aberta de forma a expor o coração. Um catéter foi introduzido no ventrículo esquerdo. Os animais foram perfundidos com tampão fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.2) seguido por 50 ml de uma solução de fixador composta por paraformaldeído a 4% diluído em PBS 1%. Após a perfusão, os cérebros foram coletados e colocados na solução fixadora de paraformaldeído (4%, pH 7,4) por 2 horas e depois em solução de sacarose 30% diluída em PBS 1% por 48 horas a 4°C.

Cortes frontais (40 µm de espessura) seriados do cérebro foram feitos em criostato a -20°C e colocados em sequência em 12 poços de uma placa de cultura de células. Desta forma, cada poço continha secções com intervalos de aproximadamente 360 µm do cérebro do animal. Os cortes foram armazenados em uma solução crioprotetora (Glicerol 25%, ethilenoglicol 25% e PO₄, 0,1M) 4°C.

3.10. Imunofluorescência

Para a marcação de neurônios, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS 1%, cada lavagem com a duração de 10 minutos. Após as lavagens, os cortes foram incubados por 1 hora com BSA 5% para bloquear os antígenos não específicos. Em seguida, os cortes foram incubados overnight, a 4°C com anticorpo primário anti-mouse (NeuN) diluído em BSA 5% 1:250. Após o tempo de incubação repetiu-se as 3 lavagens de 10 minutos com PBS 1%. Finalmente, o anticorpo secundário, Alexa 488 1:200, foi adicionado e os

cortes incubados por 3 horas. Os cortes foram lavados 2 vezes (15 minutos) com PBS 1% e uma vez com PBS 1% contendo Tween 20.

Para marcar núcleos de células em apoptose, a solução de coloração, Hoechst 33342 (diluído em PBS 1% na concentração de 0,002%) foi adicionada. Os cortes foram incubados por 2 minutos, protegidos da luz em seguida foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com PBS 1%. Por fim as lâminas foram montadas para avaliação em microscópio confocal (Carl Zeiss LSM 880), no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) – ICB - UFMG, utilizando glicerol diluído em PBS 1% 1:3. Nove campos adjacentes (com objetiva de 40x) foram capturados do estriado de cada animal e gravado como uma imagem. Duas imagens destas foram obtidas por animal. Para a análise, cada imagem foi marcada com uma grade de 16 quadrantes para facilitar a quantificação do número de neurônios viáveis (corado em verde), neurônios em apoptose (corado em verde e núcleo em azul) e outras células/ neurônio em apoptose (células com núcleo corado em azul).

3.11. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média. A comparação entre dois grupos foi feita por teste t de *Student* e para 3 ou mais grupos foi feita por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste de Newman-Keuls ou ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni, quando apropriado e mencionado na legenda das figuras. Foi considerado diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 5.01, 2015).

4. GRUPOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: Controle (Sham) injeção de veículo (0,8 µg em um volume de 5 µL), BCCAO tratado com veículo e BCCAO tratado com alamandina incluída em ciclodextrina (0,2 µg em um volume de 5 µL). A dose de alamandina foi escolhida a partir de estudo anterior do nosso laboratório (Souza *et al.*, 2017), onde uma curva dose resposta de alamandina ICV foi realizada. Os animais Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos dos animais isquemiados, excluindo-se a efetiva oclusão das artérias carótidas. O tratamento foi realizado por injeção ICV cerca de 20 min antes da oclusão das carótidas comuns. Os animais foram submetidos a avaliação do déficit neurológico 24 e 72 horas após os procedimentos. O teste de assimetria bilateral (BAT) foi realizado aproximadamente 72 horas após a isquemia/ reperfusão. Ao final dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados por decapitação, os cérebros foram coletados e divididos em dois hemisférios, um para às dosagens de citocinas e outro para a avaliação de estresse oxidativo. Todos os protocolos tiveram em comum as cirurgias de estereotaxia, oclusão das carótidas e os testes comportamentais de score neurológico e assimetria bilateral. Após a avaliação do déficit neurológico e BAT, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca para a imunofluorescência e análise em microscopia confocal.

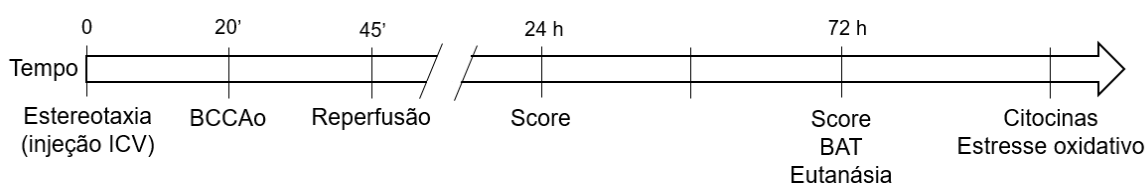


Figura 6. Protocolo experimental 1.

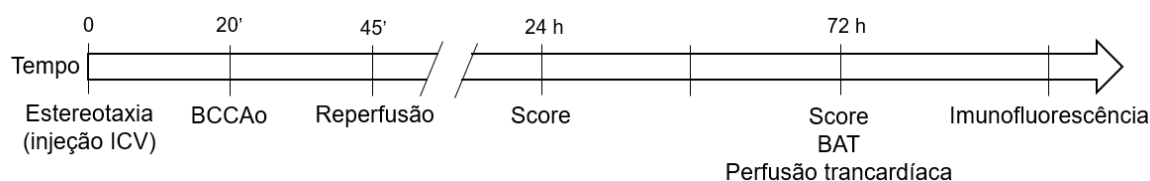


Figura 7. Protocolo experimental 2

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais: Controle: Sham WT e Sham MrgD KO; e isquemia: BCCAo WT e BCCAo MrgD KO. Os animais Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos dos animais isquemiados, excluindo-se a efetiva oclusão das artérias carótidas. Estes animais foram submetidos ao escore neurológico aproximadamente 24 e 72 horas após o procedimento de oclusão das carótidas; e o teste de assimetria bilateral (BAT) foi realizado 72 horas após a isquemia/reperfusão. Ao final dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados.

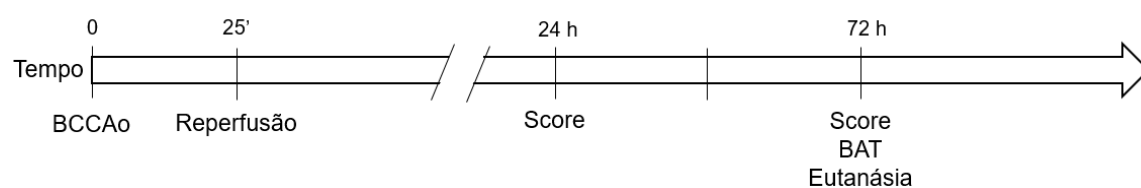


Figura 8. Protocolo experimental 3.

5. RESULTADOS

5.1. Curva de sobrevivência

Os resultados mostram que no período avaliado (72 horas), a sobrevivência dos animais é grande após o procedimento de isquemia e reperfusão, ou seja, 85-95% dos animais sobrevivem (Figura 3).

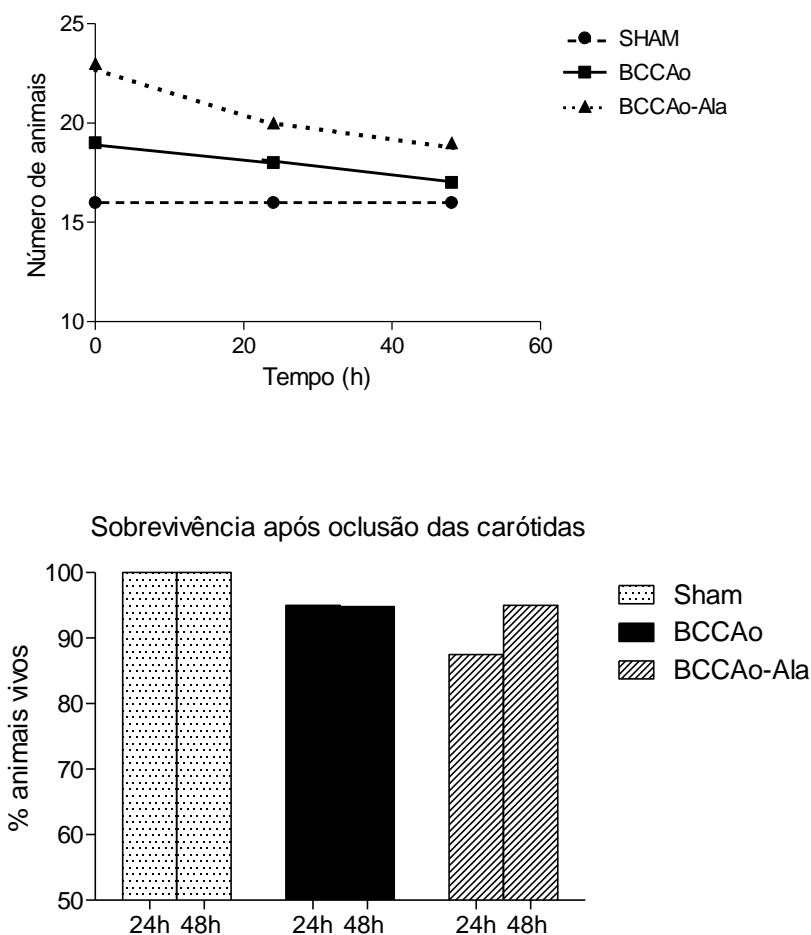


Figura 9. Curva de sobrevivência. Sobrevida dos animais submetidos às cirurgias de estereotaxia e oclusão bilateral das artérias carótidas (n= 16-23)

5.2. Escore neurológico

A figura 10 apresenta a avaliação do déficit neurológico dos ratos Sham, BCCAO controle (veículo) e BCCAO tratados com alamandina. Podemos observar que os animais SD controle (grupo Sham, n=16) apresentaram pontuação similar 24 horas ($2,94 \pm 0,33$ pontos) e 72 horas ($2,94 \pm 0,30$ pontos) após cirurgia fictícia. Como esperado, os animais isquemiados não tratados (BCCAO veículo, n=17) apresentaram aumento significativo tanto do escore 24 horas ($4,56 \pm 0,46$ pontos), quanto 72 horas após BCCAO, ($5,0 \pm 0,54$ pontos) em relação ao grupo controle ($2,94 \pm 0,33$ pontos e $2,94 \pm 0,30$ pontos, respectivamente; $p < 0.05$, one-way ANOVA). Os ratos isquemiados e tratados (BCCAO alamandina, n=19) apresentaram pontuação significativamente aumentada ($4,68 \pm 0,38$ pontos) em relação ao grupo controle no tempo de 24 horas ($2,94 \pm 0,33$ pontos). No entanto, 72 horas após o tratamento houve uma significativa redução do escore em relação à primeira avaliação deste mesmo grupo ($3,00 \pm 0,40$ pontos vs $4,68 \pm 0,38$ pontos, 24h; $p < 0.05$, one-way ANOVA). O grupo de animais tratados apresentou pontuação semelhante ao grupo de cirurgia fictícia 72 horas após cirurgia/tratamento.

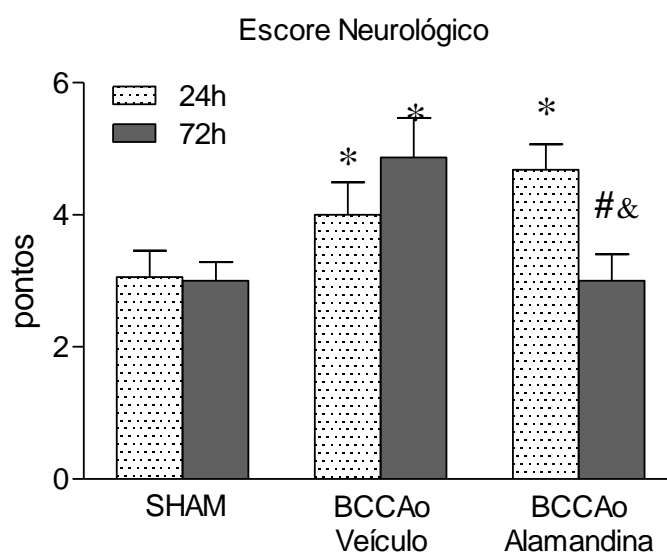
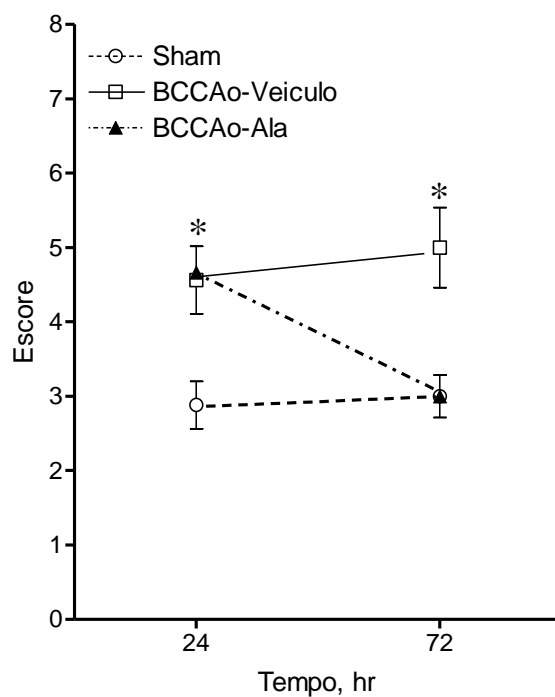


Figura 10. Avaliação do déficit neurológico pelo score de 14 pontos nos tempos de 24 e 72 horas após isquemia. Grupo Sham (n= 16), BCCAO veículo (n= 17) e BCCAO alamandina (n= 19.) Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs respectivo Sham controle; # $p < 0,05$ vs 24h; & $p < 0,05$ vs BCCAO veículo 72h (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

5.3. Teste de assimetria bilateral

Para o teste de assimetria bilateral, foram avaliadas a percepção do animal para as fitas, o tempo para a retirada da fita da primeira pata e o tempo de retirada total 72 horas após cirurgia/tratamento. Uma fita adesiva foi colocada em cada uma das patas anteriores do animal. O tempo de percepção, pode ser caracterizado pelo primeiro contato da fita com a boca do animal ou o chacoalhar das patas. Não houve diferença entre os grupos no tempo de percepção das fitas (Fig. 11A). No entanto, os animais do grupo BCCAO veículo apresentaram maior latência para remover a primeira fita ($45,14 \pm 15,63$ segundos vs $14,88 \pm 2,0$ segundos, grupo Sham). Os animais BCCAO tratados apresentaram latência semelhante ao grupo Sham ($23,22 \pm 3,38$ segundos; Fig. 11B). O tempo total para a remoção de ambas as fitas foi proporcional ao tempo de remoção apenas da primeira pata (Fig. 11C); sendo o grupo BCCAO veículo ($67,43 \pm 16,99$ segundos) o que demorou mais tempo para completar a remoção total das duas fitas, seguido do grupo tratado (BCCAO alamandina, $43,39 \pm 10,38$ segundos) e por fim, em menos tempo o grupo Sham ($24,25 \pm 3,35$ segundos). Não houve diferença quanto a pata (direita ou esquerda) para a remoção da fita, ou seja, o número de animais que removeram a fita da pata direita foi idêntico ao número de animais que removeram a fita da pata esquerda.

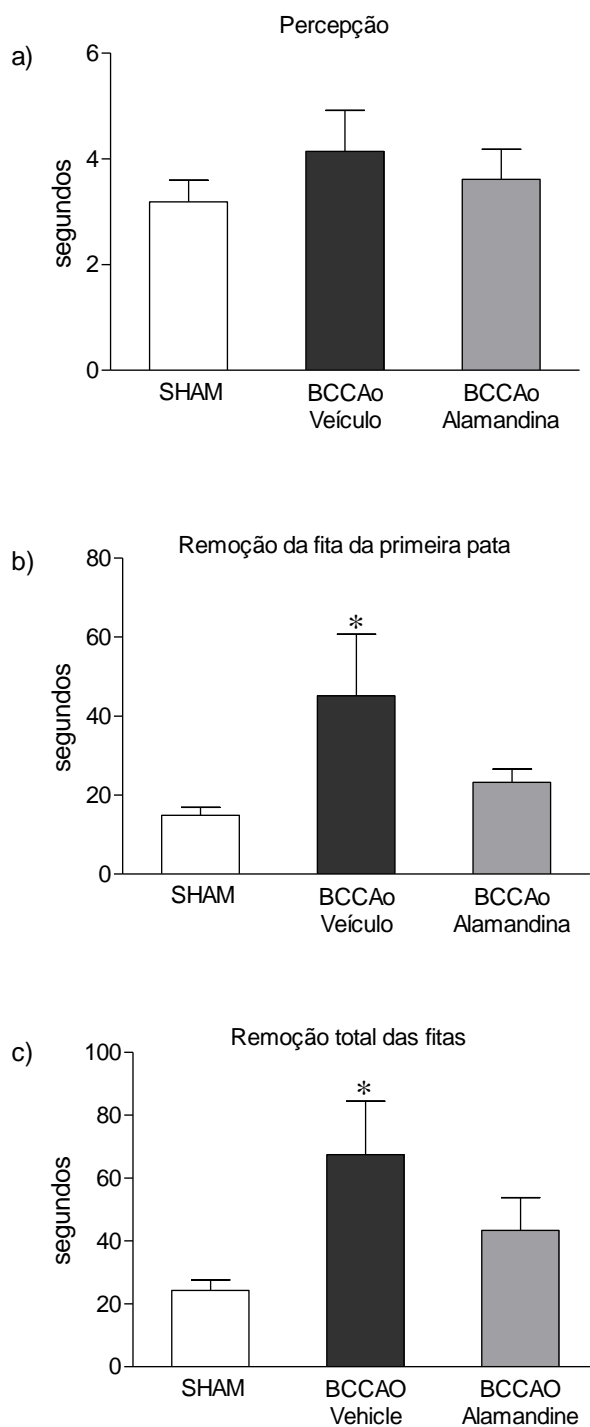


Figura 11. Teste de assimetria bilateral. O teste foi realizado 72 horas após isquemia/reperfusão em animais Sham (n=16), BCCAO veículo (n=17) e BCCAO alamandina (n=19). Em A, o tempo para a percepção das fitas; em B e C, a latência para a remoção da fita da primeira e da segunda pata, respectivamente. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

5.4. Avaliação do estresse oxidativo

A avaliação da atividade da superóxido dismutase (Fig. 12A) no sistema nervoso central 72 horas após a cirurgia/tratamento, mostrou que no grupo BCCAo veículo ($2,10 \pm 0,072$ U/mg de proteína) SOD está diminuída em relação ao grupo Sham ($3,62 \pm 0,15$ U/mg de proteína). No entanto, nos animais tratados com alamandina, houve atenuação da redução de SOD. Deve-se ressaltar, que os níveis de SOD nos animais tratados, entretanto, ($3,10 \pm 0,079$ U/mg de proteína) foram significativamente menores do que os animais Sham. A atividade de catalase (Fig. 12B) apresentou-se reduzida no grupo BCCAo veículo ($415,2 \pm 4,434$ nmol/mg de proteína) em comparação ao grupo controle ($493,4 \pm 4,402$ nmol/mg de proteína) porém, o tratamento com alamandina preveniu a redução da atividade de catalase ($496,3 \pm 18,49$ nmol/mg de proteína). A atividade de GSH (Fig. 12C) apresentou-se reduzida nos animais BCCAo veículo ($9,473 \pm 1,246$ U/mg de proteína) em relação ao grupo controle ($15,30 \pm 1,441$ U/mg de proteína). O tratamento com alamandina preveniu esta alteração ($15,38 \pm 1,090$ U/mg de proteína). Os níveis de peroxidação lipídica (Fig. 12D) no tecido cerebral apresentaram-se significativamente aumentados em BCCAo veículo ($40,53 \pm 3,441$ nmol/mg de proteína) quando comparados ao controle ($16,41 \pm 1,389$ nmol /mg de proteína). No entanto, o grupo tratado apresentou redução da peroxidação lipídica ($25,91 \pm 3,244$ nmol/mg de proteína) em comparação ao grupo BCCAo veículo.

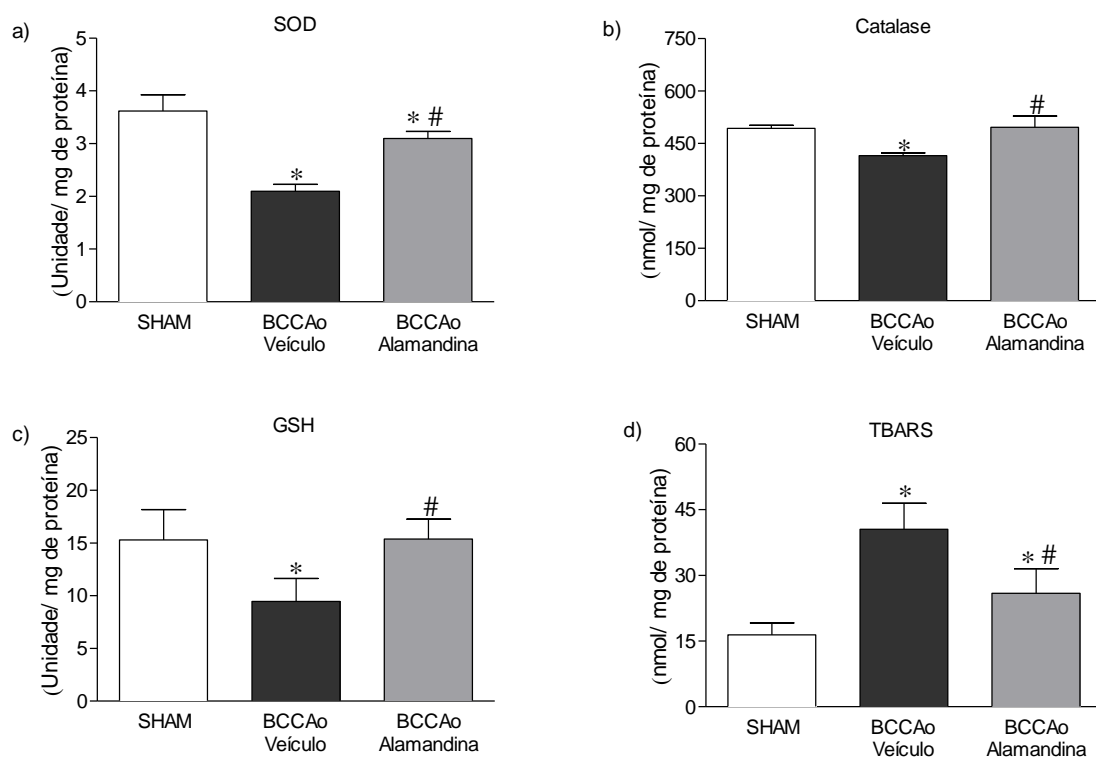


Figura 12. Atividade de SOD (A), Catalase (B) e GSH (C) e níveis de TBARS (D) no sistema nervoso central após isquemia global transitente. Sham (n= 4), BCCAo veículo (n= 3) e BCCAo alamandina (n= 3). Valores expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs BCCAo veículo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

5.5. Níveis de citocinas no cérebro

Os animais submetidos a isquemia temporária (BCCAo veículo) apresentaram aumento de citocinas pró inflamatórias TNF- α ($481,3 \pm 26,03$ ng/ml), IL-1 β ($144,3 \pm 5,063$ ng/ml) e IL-6 ($270,6 \pm 16,09$ ng/ml) em relação ao grupo Sham ($54,52 \pm 6,872$; $31,70 \pm 3,196$; $55,46 \pm 4,545$ ng/ml, respectivamente Fig. 13). O tratamento com alamandina atenuou significativamente o aumento de TNF- α ($311,0 \pm 43,29$ ng/ml), IL-1 β ($94,46 \pm 5,537$ ng/ml) e IL-6 ($206,1 \pm 10,30$ ng/ml), em relação aos animais não tratados (Fig. 13). Além disso, os animais BCCAo veículo apresentaram aumento dos níveis de IL-10, ($143,7 \pm 24,15$ vs $44,15 \pm 2,413$ ng/ml; Sham). Por outro lado, os níveis de IL-10 apresentaram-se aumentados nos ratos tratados ($187,7 \pm 8,774$ ng/ml) não diferindo dos valores obtidos no grupo de animais não tratados.

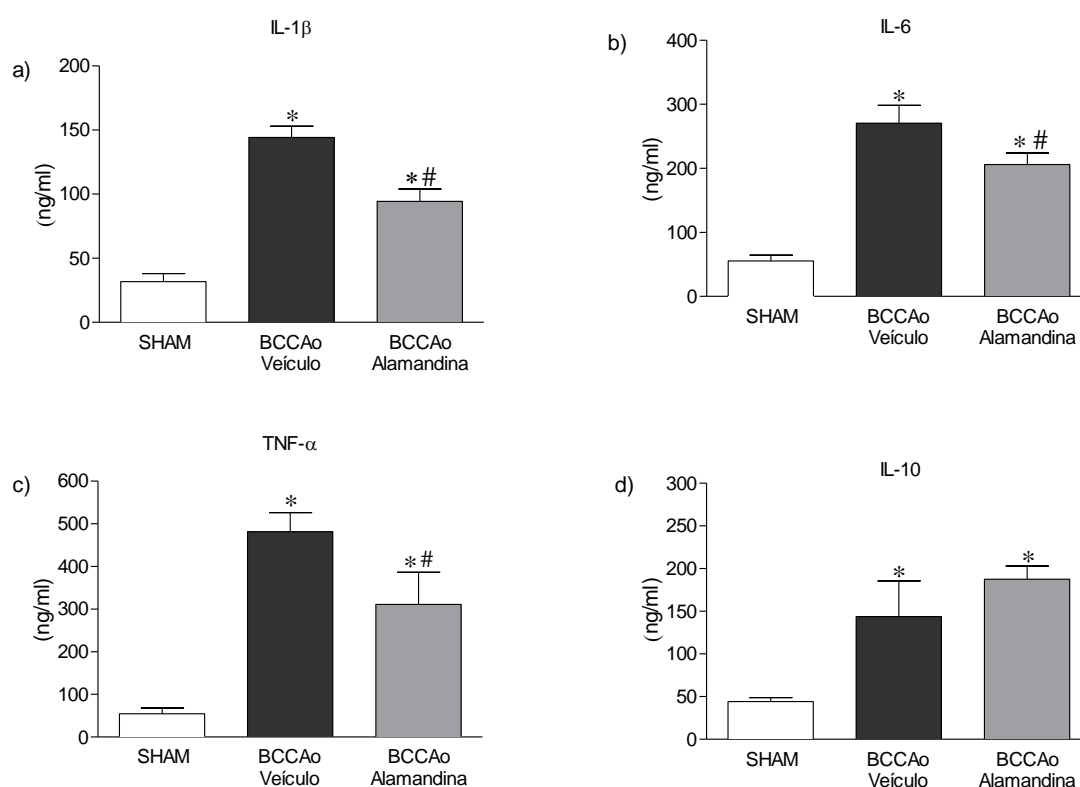


Figura 13. Níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no sistema nervoso central após isquemia global transiente. Grupo Sham (n= 4), BCCAo veículo (n= 3) e BCCAo alamandina (n= 3). Valores expressos como média \pm erro padrão. *p< 0,05 vs controle; #p< 0,05 vs BCCAo veículo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

5.6. Avaliação de neurônios em apoptose

A Figura 14 apresenta imagens representativas de cortes frontais do cérebro na região dos corpos estriados de animais controle, isquemiados tratados ou não com alamandina ilustrando a marcação imunofluorescente para núcleos em apoptose. Os animais submetidos a isquemia temporária (BCCAO veículo) apresentaram redução de neurônios viáveis ($8,5 \pm 2,3\%$; Figura 16 B) em relação ao grupo controle ($88,2 \pm 10,8\%$; Figura 16 A), embora o número de animais no grupo SHAM não permita avaliação estatística. O tratamento com alamandina atenuou a perda de neurônios induzida pela isquemia ($32,7 \pm 6,6\%$ vs $8,5 \pm 2,3\%$ no grupo BCCAO; teste t de Student Figura 16 C). A isquemia aumentou a apoptose de neurônios do estriado do grupo BCCAO ($60,59 \pm 3,152\%$ vs $3,34 \pm 2,31\%$, no grupo Sham; Figura 16) e BCCAO tratado com alamandina ($47,33 \pm 7,37\%$ vs $3,34 \pm 2,31\%$, no grupo Sham; Figura 16). Resultado similar foi observado em relação as demais células em apoptose (Figura 16). Quando foi avaliado o total de células em apoptose, ou seja, a soma de neurônios e outras células com núcleos apoptóticos, o grupo BCCAO veículo apresentou maior proporção de morte celular programada ($91,8 \pm 2,4\%$) em relação ao grupo tratado com alamandina ($67,2 \pm 6,6$; Figura 16).

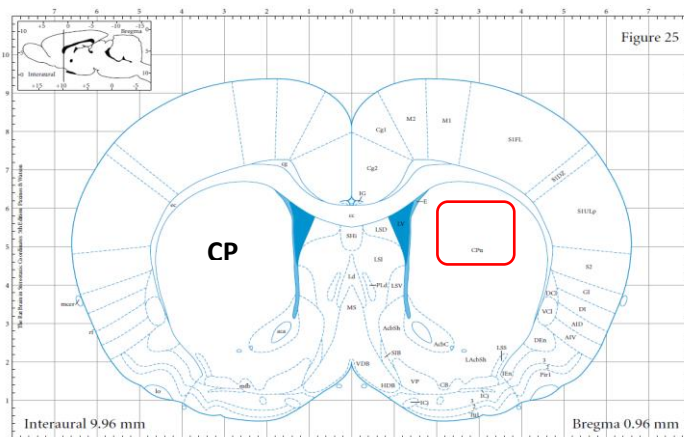


Figura 14. Diagrama de corte frontal do cérebro de rato do atlas de Paxinos e Watson (2002) ilustrando a região do estriado utilizada para quantificação de neurônios (quadrado vermelho).

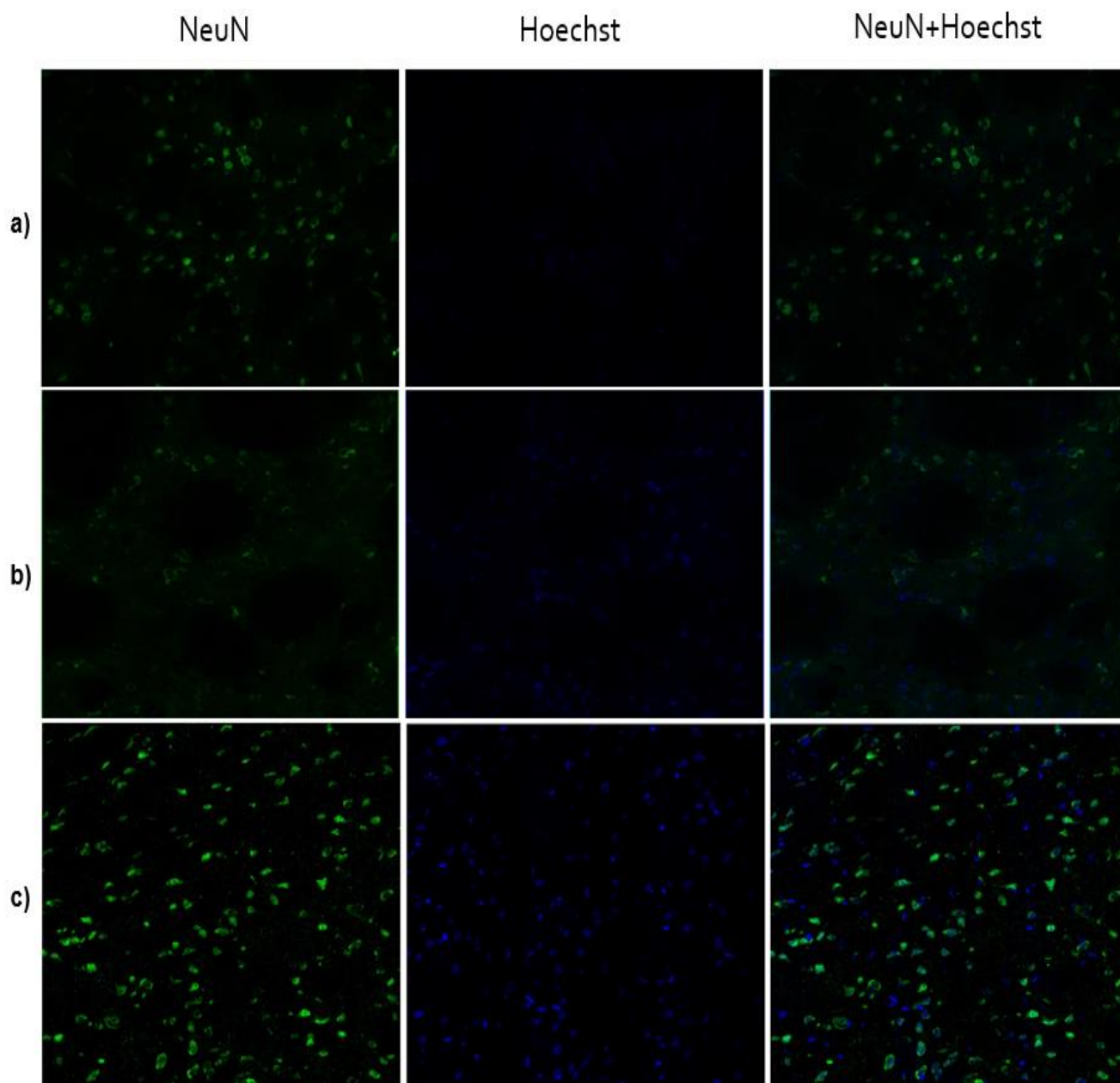


Figura 15. Avaliação de neurônios em apoptose. A-C, imagens representativas de cortes frontais do cérebro de ratos SHAM (B; n=2), BCCAo (C; n=4) e BCCAo tratado com alamandina (D; n=3) ilustrando a marcação imunofluorescente para corpo neuronal (NeuN; verde) e núcleo em apoptose (Hoechst 33342) da região dos corpos estriados. *CPu*= Núcleo Caudado e Núcleo Putamem.

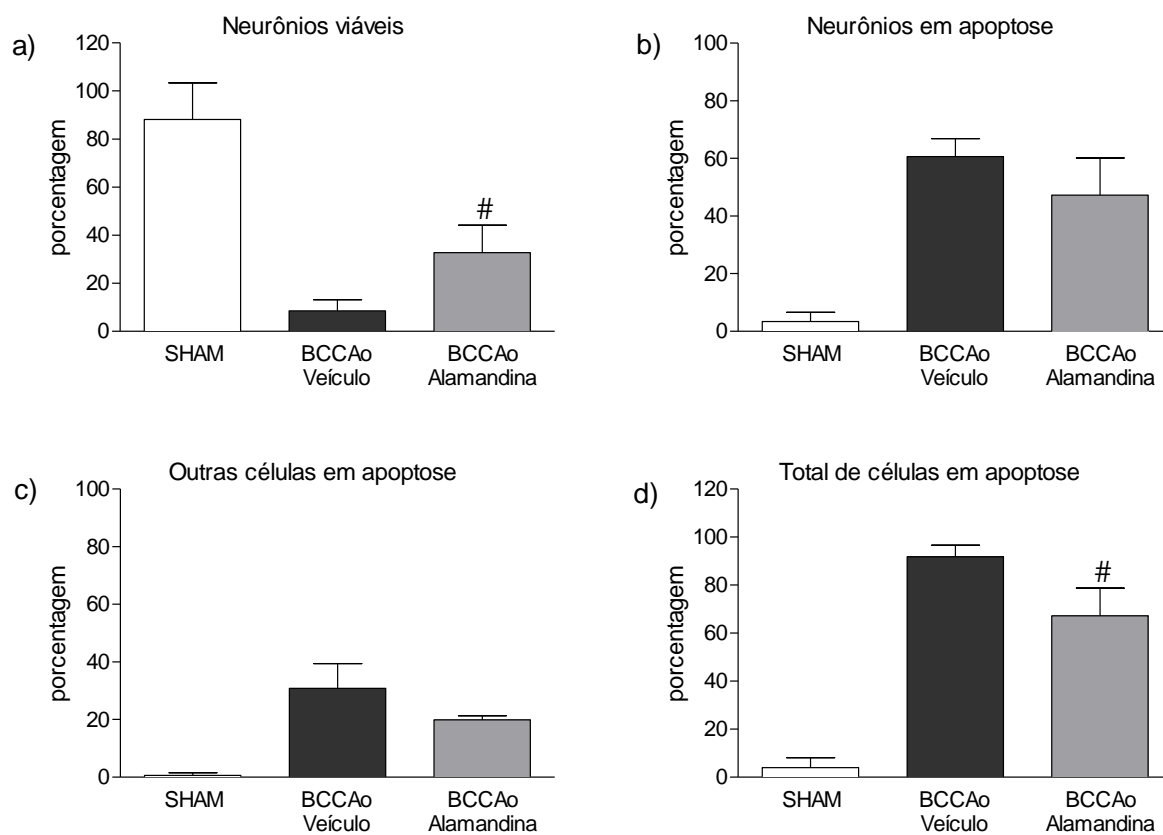


Figura 16. Porcentagem de células em apoptose. Porcentagem de neurônios viáveis (A), neurônios em apoptose (B), demais células em apoptose (C) e o total de células em apoptose (D) da região dos corpos estriados de ratos Sham, BCCAO, BCCAO tratado com alamandina. # $p < 0,05$ em relação ao BCCAO não tratado (teste t de *Student*).

5.7. Avaliação do déficit neurológico em camundongos

Os resultados apresentados mostram que a alamandina atenua as alterações sensoriais e motoras, induzidas por isquemia e reperfusão. Com o objetivo de avaliar a participação do receptor MrgD utilizamos camundongo com deleção (*knockout* KO) para este receptor. Os resultados mostram que os animais controle, não isquemiados, WT Sham (n=6) e MrgD KO (n=8), não apresentaram diferença de escore neurológico nos tempos avaliados ($1,67 \pm 0,33$ e $1,87 \pm 0,13$ pontos, em 24 horas, e $1,17 \pm 0,30$ e $1,75 \pm 0,25$ pontos, em 72 horas, respectivamente Figura 17). O grupo de animais isquemiados BCCAO MrgD KO apresentou escore significativamente maior 24h após a isquemia ($4,25 \pm 0,83$ pontos) em relação ao seu respectivo controle, que foi atenuado em 72 horas ($2,13 \pm 0,71$). No entanto, os animais WT BCCAO não apresentaram diferença em relação ao grupo controle em nenhum dos tempos avaliados ($3 \pm 0,61$ para 24 horas e $1,43 \pm 0,48$ para 72 horas; Figura 17).

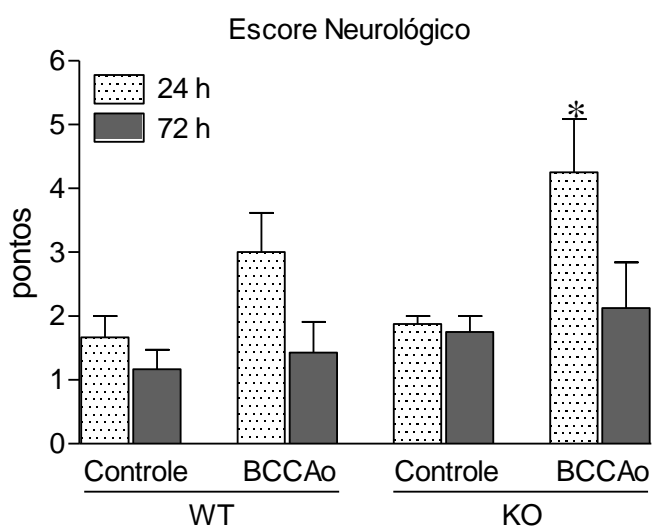
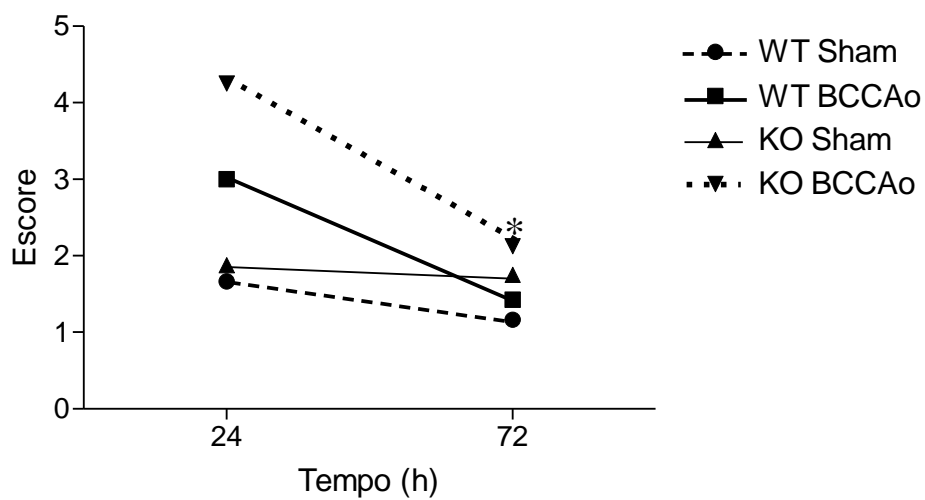


Figura 17. Avaliação do déficit neurológico em animais Sham C57BL/6J (WT; n= 6), Sham MrgD KO (KO; n=8), BCCAO C57BL/6J (n= 7) e BCCAO MrgD KO (n= 8). Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle 24h (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, mostramos que a injeção central de alamandina em modelo animal de isquemia e reperfusão produz efeito anti-inflamatório e antioxidante, reduz morte neuronal nos corpos estriados, além de atenuar o déficit neurológico dos animais. Estes resultados indicam que a alamandina apresenta efeito neuroprotetor.

Neste trabalho avaliamos inicialmente o comportamento motor e sensorial dos animais após o período de isquemia/reperfusão. Como esperado, os animais que foram submetidos a isquemia cerebral obtiveram maior pontuação na escala de comprometimento e maior latência para a retirada das fitas no teste somatossensorial. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que após AVE os animais exibem uma variedade de déficits neurológicos (Chen *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2012; Schaar; Brenneman; Savitz, 2010; Woitzik *et al.*, 2006). No entanto, os animais que receberam o tratamento com alamandina apresentaram atenuação do comprometimento das funções neurológicas e, 72h após cirurgia/tratamento, estes animais apresentaram pontuação semelhante à do grupo controle. Durante a avaliação somatossensorial, observamos também que não houve diferença entre os grupos experimentais, entre retirar primeiro a fita da pata direita ou esquerda, sugerindo que a lesão induzida pela isquemia global não afeta preferencialmente um lado do SNC.

O comprometimento neurológico dos animais foi revertido 72h após cirurgia/tratamento, provavelmente devido a inclusão da alamandina em HP β CD. Quando a HP β CD é administrada sistemicamente, apresenta tempo de meia vida de aproximadamente 1,6 horas, no entanto, o tempo de meia vida da HP β CD é maior quando administrado diretamente no SNC, cerca de 6,5 horas (Aqul *et al.*, 2011). Estudos anteriores mostraram que a concentração plasmática máxima de Ang-(1-7) foi obtida 6 horas após a administração de Ang-(1-7)/HP β CD (Marques *et al.*, 2011). Do mesmo modo, Lautner *et al.* (2013) mostraram que a administração oral de alamandina incluída

em HP β CD, produz efeitos anti-hipertensivos em ratos espontaneamente hipertensos e efeitos cardioprotetores em ratos tratados com isoproterenol no período de observação de 5 horas. Estes dados sugerem que a liberação de alamandina incluída em HPBCD deve ser lenta e perdurar por tempo superior a 6h após a injeção ICV. No entanto, estudos futuros serão necessários para se estabelecer a cinética de liberação da alamandina/HP β CD após administração ICV.

De forma geral, os animais apresentaram baixo grau de comprometimento neurológico, ou seja, pequena pontuação nos testes comportamentais. Este resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo modelo utilizado (oclusão bilateral transitória das carótidas comuns). Os efeitos decorrentes da isquemia são variáveis e dependem da técnica de oclusão, número de vasos ocluídos e duração da isquemia. A maioria dos trabalhos na literatura utiliza oclusão bilateral permanente das carótidas comuns (Farkas; Luiten; Bari, 2007; Yang, G. *et al.*, 1997; Yanpallewar, 2004), ou oclusão das carótidas comuns associado a oclusão das artérias vertebrais (Busch *et al.*, 2003; Kameyama *et al.*, 1985; Pulsinelli; Buchan, 1988), ou oclusão transitória da arterial cerebral media (Carmichael, 2005; Chen *et al.*, 2005; Kakkar *et al.*, 2013; Mitsufuji *et al.*, 1996) ou interrupção do fluxo sanguíneo por períodos mais prolongados de até 60 minutos (Carmichael, 2005; Mitsufuji *et al.*, 1996). Estes modelos resultam em alterações clínicas mais exuberantes, no que diz respeito às alterações comportamentais e morte neuronal. No entanto, em estudo anterior ainda não publicado de nosso laboratório a oclusão bilateral das carótidas comuns por 25 min induziu alteração comportamental significativa (Kangussu *et al.*, 2017).

Existem vários mecanismos neuroprotetores descritos na literatura: inibição da despolarização espontânea, redistribuição de fluxo sanguíneo cerebral, redução da liberação de glutamato, antagonismo do receptor NMDA, potencialização do ácido gama-aminobutírico (GABA) e ação antioxidante (Dirnagl, 2016; Jenkins *et al.*, 2001; Mitsutaka Sugimuraa *et al.*, 2002; Wilson; Gelb, 2002). O tratamento com alamandina reduziu o

estresse oxidativo, atenuando a peroxidação lipídica, a redução da atividade da SOD, além de prevenir a redução da atividade da CAT e GSH. Estes resultados indicam que a alamandina é capaz de aumentar a atividade de mecanismos antioxidantes neste modelo de isquemia e reperfusão, como está ilustrado pela figura 18. Este resultado foi similar ao efeito neuroprotetor da Ang-(1-7) identificado por Jiang *et al.*, (2012), que mostraram redução nos níveis de estresse oxidativo (pelo aumento da atividade da SOD e redução dos níveis de MDA) após isquemia cerebral. Uma vez que a isquemia aumenta o estresse oxidativo e a liberação de EROs ativa vias que estimulam a produção de mediadores inflamatórios, que por sua vez participam de forma importante da fisiopatologia do AVE (Chan, 1996; Sieber *et al.*, 2011), avaliamos também neste estudo os níveis cerebrais das citocinas TNF α , IL-1 β e IL-6 e IL-10.

Os resultados mostraram que a alamandina atenua os níveis dessas citocinas pró inflamatórias. Além disso, os níveis de IL-10, citocina que desempenha papel anti-inflamatório, apresentaram-se elevados nos dois grupos de animais isquemiados, tratados ou não. Não há estudos na literatura avaliando o efeito da alamandina sobre níveis de citocinas no SNC. No entanto, trabalho ainda não publicado de nosso laboratório (Gregório *et al.*, 2017), que estuda o efeito do tratamento com alamandina em animais submetidos a modelo murino de asma, mostrou que a alamandina atenuou a expressão de IL-13 sem alterar os níveis aumentados de IL-5, que são citocinas importantes na fisiopatologia da asma. Por outro lado, o tratamento com alamandina induziu uma tendência de aumento dos níveis de IL-10 neste modelo. Além disso, o tratamento com alamandina atenuou a liberação de quimiocinas no pulmão. Estes dados sugerem que a alamandina apresenta importante papel anti-inflamatório, o que é corroborado pelos os achados do presente estudo.

O efeito anti-inflamatório da alamandina também parece similar ao descrito para a Ang-(1-7). Jiang *et al.*, (2012) mostraram que a infusão ICV de Ang-(1-7), além de reduzir a área de isquemia e melhorar o déficit neurológico, suprimiu a ativação de NF- κ B, reduziu

os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e COX-2 no SNC. Neste trabalho os autores mostraram que a atenuação da inflamação desencadeada pela isquemia, foi revertida pela administração do antagonista seletivo da Ang-(1-7), o A-779. Por outro lado, o antagonista do receptor AT2/MrgD, o PD123319, não alterou o efeito da Ang-(1-7). Em conjunto, os dados obtidos no nosso trabalho apoiam a hipótese de que a injeção ICV de alamandina/ HP β CD é capaz de contribuir para a neuroproteção através do aumento de mecanismos antioxidantes e redução de citocinas pró-inflamatórias. Estudos futuros deverão avaliar qual subtipo de receptor angiotensinérgico está envolvido no efeito da alamandina.

Considerando os resultados obtidos e que o principal receptor descrito para a mediar os efeitos da alamandina, o MrgD, está amplamente expresso no cérebro (Oliveira et al, 2016), avaliamos se a ausência do receptor MrgD poderia piorar as alterações comportamentais observadas nos animais submetidos a isquemia/ reperfusão. Nossos resultados mostraram que camundongos MrgDKO apresentaram escore neurológico maior 24h após a isquemia do que os animais WT, sugerindo que a deleção do receptor MrgD agrava as alterações decorrentes da isquemia e reperfusão. Animais MrgDKO aparentemente não apresentam alteração do eixo ECA2/Ang-(1-7) /Mas. Desta forma, o agravamento das alterações comportamentais sugere que o eixo Alamandina/MrgD é uma via contraregulatória importante, e que a ausência da atividade deste eixo não é compensada pelo eixo ECA2/ Ang-(1-7)/Mas, ou ainda, neste modelo de isquemia cerebral ocorre redução dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) e/ou alamandina. Estudos futuros serão necessários para se esclarecer estas possibilidades.

Em nosso estudo verificamos por imunofluorescência que o tratamento com alamandina atenuou a perda de neurônios/ células na região do estriado, uma área no SNC importante para o controle motor. Este dado corrobora nossos achados nos testes comportamentais, reforçando o efeito neuroprotetor da alamandina, o que contribuiu para o melhor desempenho motor dos animais. Embora o número de animais no grupo Sham

tenha sido pequeno ($n=2$), a diferença observada entre o grupo Sham e os grupos de animais isquemiados foi bastante expressiva. Este estudo deverá ser repetido com número maior de animais para confirmar estes achados. Além disso, outras áreas do SNC, tais como hipocampo e córtex sabidamente afetadas pelo modelo de isquemia utilizado (BCCAO) (Iwasaki *et al.*, 1989; Lapi, 2012; Soria *et al.*, 2013; Zheng, H.; Lapointe; Hekiml, 2010), deverão ser avaliadas.

A alamandina desencadeia a maior parte de seus efeitos biológicos através da interação com um subtipo específico de receptor, o MrgD, enquanto que a Ang-(1-7) desempenha suas ações através do subtipo de receptor, Mas. No entanto, enquanto ECA2 é uma enzima importante para a geração da Ang-(1-7), a enzima envolvida na geração de alamandina, endogenamente, ainda é desconhecida. Ainda não sabemos como os níveis de Ang-(1-7) e alamandina se alteram em diferentes doenças, tais como no AVE. A maioria dos efeitos desencadeados pela alamandina e, descritos até o presente, é similar aos desencadeados pela Ang-(1-7), sugerindo que a alamandina também faça parte de uma via contrarreguladora do SRA. No entanto, estudos futuros serão necessários para se estabelecer a importância relativa destes peptídeos na fisiopatologia ou tratamento de diversas doenças.

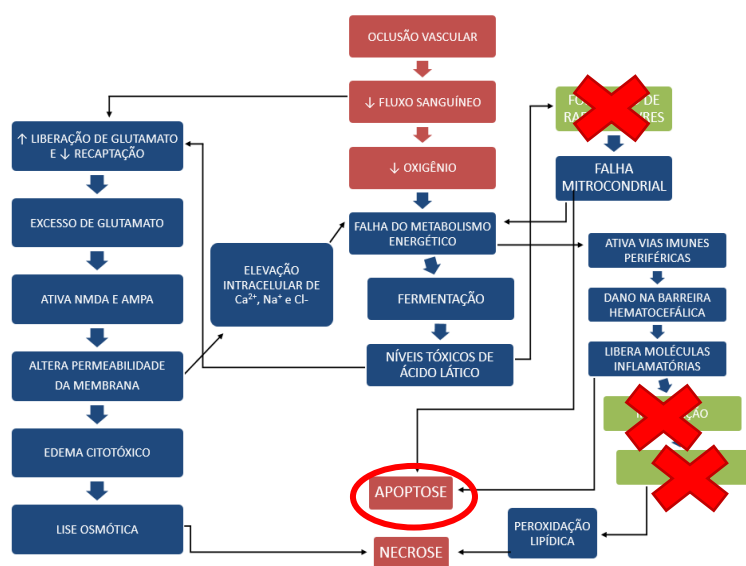


Figura 18. Cascata simplificada de eventos subsequentes a isquemia cerebral decorrente de oclusão vascular e principais mecanismos neuroprotetores da alamandina. (Adaptado de Durukan, 2007).

7. CONCLUSÃO

Neste estudo mostramos, pela primeira vez, que a injeção ICV de alamandina produz efeito anti-inflamatório e antioxidante, reduz a morte neuronal e atenua o déficit neurológico de animais submetidos a modelo de isquemia e reperfusão cerebral, sugerindo que a alamandina apresenta efeito neuroprotetor.

8. REFERÊNCIAS

- ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radical Biol Med* . 39(3):297–316, 2005.
- ALMEIDA, J.R.Q; Alamandine Improves Cardiac Function In Isolated Hearts Of TGR(MREN2)27. Resumo apresentado no Congresso: XI International Symposium on Vasoactive Peptides; 2017.
- ALOISI, F. Immune function of microglia. *Glia*, v. 36, n. 2, p. 165–179,. 2001.
- AMADATSU, T. *et al.* Macrophage-Derived Angiopoietin-Like Protein 2 Exacerbates Brain Damage by Accelerating Acute Inflammation after Ischemia-Reperfusion. *PLOS ONE*, v. 11, n. 11, 18, 2016.
- AQUL, A. *et al.* Unesterified Cholesterol Accumulation in Late Endosomes/Lysosomes Causes Neurodegeneration and Is Prevented by Driving Cholesterol Export from This Compartment. *J Neurosci*, v. 31, n. 25, p. 9404–9413, 2011.
- ARROJA, M. M. C.; REID, E.; MCCABE, C. Therapeutic potential of the renin angiotensin system in ischaemic stroke. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, v. 8, n. 1, 2016.
- BENNION, D. M. *et al.* Neuroprotective Mechanisms of the ACE2–Angiotensin-(1-7)–Mas Axis in Stroke. *Current Hypertension Reports*, v. 17, n. 2, 2015.
- BOGOUSSLAVSKY, J.; VAN MELLE, G.; REGLI, F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke*, v. 19, n. 9, p. 1083–1092, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROUGHTON, B. R. S.; REUTENS, D. C.; SOBEY, C. G. Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke*, v. 40, n. 5, p. e331–e339, 2009.
- BRUCE AJ *et al.* *Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors*. *Nat. Med.* 788-94, 1996
- BUSCH, H.-J. *et al.*, Arteriogenesis in Hypoperfused Rat Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 23, n. 5, p. 621–628, 2003.
- CAPLAN, L. R.; HIER, D. B.; D'CRUZ, I. Cerebral embolism in the Michael Reese stroke registry. *Stroke*, v. 14, n. 4, p. 530–536, 1983.
- CARMICHAEL, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, v. 2, n. 3, p. 396–409, 2005.
- CHAMORRO, A.; HALLENBECK, J. The Harms and Benefits of Inflammatory and Immune Responses in Vascular Disease. *Stroke*, v. 37, n. 2, p. 291–293, 2006.

- CHAN, P. H. Role of Oxidants in Ischemic Brain Damage. *Stroke*, v. 27, n. 6, p. 1124–1129, 1996.
- CHEN, J. *et al.* Atorvastatin Induction of VEGF and BDNF Promotes Brain Plasticity after Stroke in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 25, n. 2, p. 281–290, 2005.
- CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation*, v. 11, n. 1, p. 98, 2014.
- DANTONGARY H; W. DALTON DIETRICH. Inflammatory Mechanisms after Ischemia and Stroke. *J. Neuropathol. Exp Neurol* 127-136, 2003.
- DAVALOS, D. *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 6, p. 752–758, 2005.
- D. YUÈ CEL *et al.* Evidence of increased oxidative stress by simple measurements in patients with dilated cardiomyopathy. *Scand J Clin Lab Invest.* 62(6):463-8., 2002.
- DE SOUZA-NETO *et al.*, Alamandine Attenuates Arterial Remodelling Induced By Transverse Aortic Constriction In Mice. Resumo apresentado no Congresso: Xi International Symposium On Vasoactive Peptides; 2017.
- DEL ZOPPO, G. J. *et al.* Microglial Activation and Matrix Protease Generation During Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*, v. 38, n. 2, p. 646–651, 2007.
- DIRNAGL, U. (Org.). *Rodent Models of Stroke*. New York, NY: Springer New York, 2016. v. 120).
- DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 87, n. 1, p. 179–197, 2007.
- EVA ENGVALL; ERKKI RUOSLAH. Binding Of Soluble Form Of Fibroblast Surface Protein, Fibronectin, To Collagen. *Int J Cancer* 15;20(1):1-5, 1977
- FARKAS, E.; LUITEN, P. G. M.; BARI, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*, v. 54, n. 1, p. 162–180, 2007.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Hypertension*, v. 38, n. 3, p. 665–668, 2001.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.
- FRIDOVICH, I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 23, n. 1, p. 239–257, 1983.
- GAO, R. *et al.* Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998.

- GEMBARDT, F. *et al.* Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 319, n. 1–2, p. 115–123, 2008.
- GINSBERG, M. D.; BUSTO, R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, v. 20, n. 12, p. 1627–1642, 1989.
- GREGORIO, J.F.; Alamandine Prevents Allergic Pulmonary Inflammation Through Suppression Of NF-KB. Resumo apresentado no Congresso: XI International Symposium on Vasoactive Peptides; 2017.
- GROS, A.; OLLIVIER, V.; HO-TIN-NOË, B. Platelets in Inflammation: Regulation of Leukocyte Activities and Vascular Repair. *Frontiers in Immunology*, v. 5, 2015.
- GROTH, W. *et al.* Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *Journal of hypertension*, v. 21, n. 11, p. 2175–2182, 2003.
- GUIMARAES, P. S. *et al.* Increasing Angiotensin-(1–7) Levels in the Brain Attenuates Metabolic Syndrome–Related Risks in Fructose-Fed Rats. *Hypertension*, v. 63, n. 5, p. 1078–1085, 2014.
- H. BOUTIN *et al.* *Role of IL-1a and IL-1b in Ischemic Brain Damage*. . [S.l.: s.n.]. , 2001
- HALL, J. E. Control of blood pressure by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Clinical cardiology*, v. 14, n. S4, p. 6–21, 1991.
- HABIYAKARE, B. *et al.* Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *International Journal of Experimental Pathology*, v. 95, n. 4, p. 290-5, 2014.
- HAQQANI, A. S. *et al.* Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *The FASEB Journal*, v. 19, n. 13, p. 1809–1821, 2005.
- HELLNER, K. *et al.* Angiotensin-(1–7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 29, n. 3, p. 427–435, 2005.
- HERATH, C. B. *et al.* Angiotensin-(1-7) reduces the perfusion pressure response to angiotensin II and methoxamine via an endothelial nitric oxide-mediated pathway in cirrhotic rat liver. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 304, n. 1, p. G99–G108, 2013.
- HOMI, H. M. *et al.* Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion. *Neuroscience letters*, v. 333, n. 1, p. 37–40, 2002.
- HOSSMANN, K.-A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovascular Research*, v. 39, n. 1, p. 106–120, 1998.
- IWASAKI, Y. *et al.* Forebrain ischemia induced by temporary bilateral common carotid occlusion in normotensive rats. *Journal of the neurological sciences*, v. 90, n. 2, p. 155–165, 1989.

- JANKOWSKI, V. *et al.* Mass-Spectrometric Identification of a Novel Angiotensin Peptide in Human Plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 27, n. 2, p. 297–302, 2006.
- JENKINS, A. *et al.* Evidence for a common binding cavity for three general anesthetics within the GABAA receptor. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 6, p. RC136–RC136, 2001.
- JIANG, T. *et al.* Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia: Effect of Ang-(1-7) on neuroinflammation. *British Journal of Pharmacology*, v. 167, n. 7, p. 1520–1532, 2012.
- JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 87, n. 5, p. 779–789, 2010.
- JIWA, N. S.; GARRARD, P.; HAINSWORTH, A. H. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review: Vascular cognitive impairment: in vivo models. *Journal of Neurochemistry*, v. 115, n. 4, p. 814–828, 2010.
- JOE M. MCCORD. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. . . *N Engl J Med* 17;312(3):159-63. Franklin H. Epstein. , 1985
- JONES, D. P. *et al.* Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 28, n. 4, p. 625–635, 2000.
- KAKKAR, V. *et al.* Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: An efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 85, n. 3, p. 339–345, 2013.
- KANGUSSU LM *et al.*, 2017 Transgenic Rat With Overproduction Of Brain Angiotensin-(1-7) Presents Neuroprotection In A Model Of Ischemia And Reperfusion. Congresso: 38 IUPS; 2017.
- KAMEYAMA, M. *et al.* A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat—three vessel occlusion model. *Stroke*, v. 16, n. 3, p. 489–493, 1985.
- KATE LYKKE LAMBERTSEN; KNUT BIBER; BENTE FINSEN. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. 2012.
- KOMOTAR, R. J. *et al.* Neurologic assessment of somatosensory dysfunction following an experimental rodent model of cerebral ischemia. *Nature Protocols*, v. 2, n. 10, p. 2345–2347, 2007.
- KUMAR, A.; AAKRITI; GUPTA, V. A review on animal models of stroke: An update. *Brain Research Bulletin*, v. 122, p. 35–44, 2016.
- LAI, A. Y.; TODD, K. G. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled Young

- Investigator's Forum. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 84, n. 1, p. 49–59, 2006.
- LALANCETTE-HEBERT, M. *et al.* Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 10, p. 2596–2605, 2007.
- LAPI, D. Protective effects of quercetin on rat pial microvascular changes during transient bilateral common carotid artery occlusion and reperfusion. *Frontiers in Physiology*, v. 3, 2012..
- LAUTNER, R. Q. *et al.* Discovery and Characterization of Alamandine A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circulation research*, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 2013.
- LAZARONI, T. L. N. *et al.* Angiotensin-(1–7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 97, n. 1, p. 113–123, 2012.
- LEMOS, V. S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats. *British journal of pharmacology*, v. 135, n. 7, p. 1743–1748, 2002.
- LIPSKA, K. *et al.* Risk factors for acute ischaemic stroke in young adults in South India. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 78, n. 9, p. 959–963, 2007.
- LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke: Neurological diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 4, n. 5, p. 399–414, 2003.
- MARQUES, F. D. *et al.* An Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats. *Hypertension*, v. 57, n. 3, p. 477–483, 2011.
- MARINS, R. F. *et al.* Alamandine but not angiotensin-(1-7) produces cardiovascular effects in the Insular Cortex. *Hypertension*. 64:A306, 2014.
- MECCA, A. P. *et al.* Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke: Angiotensin-(1-7) cerebroprotection during stroke. *Experimental Physiology*, v. 96, n. 10, p. 1084–1096, 2011.
- MICHAEL STEIN *et al.* Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation. *J Exp Med*. 1;176(1):287-92., 1992
- MITSUFUJI, N. *et al.* A new model of transient cerebral ischemia in neonatal rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 16, n. 2, p. 237–243, 1996.
- MITSUTAKA SUGIMURAA *et al.* Effects of GABAergic agents on anesthesia induced by halothane, isoflurane, and thiamylal in mice. *J Exp Med*. 1;176(1):287-92., 2002
- NARAYANAN PARAMESWARAN; SONIKA PATIAL. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. . *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 20(2):87-103. , 2010

- NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 474–478, 1972.
- OLIVEIRA *et al.*, Distribuição e aspectos morfofuncionais do receptor de Alamandina, MrgD, em roedores. Tese de doutorado do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.
- PEREGO, C.; FUMAGALLI, S.; DE SIMONI, M.-G. Three-dimensional Confocal Analysis of Microglia/macrophage Markers of Polarization in Experimental Brain Injury. *Journal of Visualized Experiments*, n. 79, 2013.
- PLASCHKE, K. *et al.* Neuromodulatory effect of propentofylline on rat brain under acute and long-term hypoperfusion. *British journal of pharmacology*, v. 133, n. 1, p. 107–116, 2001.
- PULSINELLI, W. A.; BUCHAN, A. M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*, v. 19, n. 7, p. 913–914, 1988.
- PUN, P. B. L.; LU, J.; MOOCHHALA, S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radical Research*, v. 43, n. 4, p. 348–364, 2009.
- QARADAKHI, T.; APOSTOLOPOULOS, V.; ZULLI, A. Angiotensin (1-7) and Alamandine: Similarities and differences. *Pharmacological Research*, v. 111, p. 820–826, set. 2016.
- REGENHARDT, R. W. *et al.* Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology*, v. 71, p. 154–163, 2013.
- REGENHARDT, R. W. *et al.* Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: Angiotensin-(1-7) and hypertension-induced stroke. *Experimental Physiology*, v. 99, n. 2, p. 442–453, 2014.
- REN, X. *et al.* Regulatory B Cells Limit CNS Inflammation and Neurologic Deficits in Murine Experimental Stroke. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 23, p. 8556–8563, 2011.
- ROTSCHENKER, S. The Role of Galectin-3/MAC-2 in the Activation of the Innate-Immune Function of Phagocytosis in Microglia in Injury and Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 39, n. 1–2, p. 99–103, 2009.
- SAAVEDRA, J. M. Brain Angiotensin II: New Developments, Unanswered Questions and Therapeutic Opportunities. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 25, n. 3–4, p. 485–512, 2005.
- SAMPAIO, W. O. *et al.* Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, v. 49, n. 1, p. 185–92, Jan 2007. ISSN 1524-4563.

- SANTOS, R. A. *et al.* Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003.
- SCHAAR, K. L.; BRENNEMAN, M. M.; SAVITZ, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & translational stroke medicine*, v. 2, n. 1, p. 13, 2010.
- SCHALLERT, T. *et al.* Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 16, n. 3, p. 455–462, 1982.
- SCHELP, A. O. *et al.* Incidência de disfagia orofaríngea após acidente vascular encefálico em hospital público de referência. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 62, n. 2–B, p. 503–506, 2004.
- SCHMIDT-KASTNER, R. *et al.* Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Brain Research*, v. 1052, n. 1, p. 28–39, 2005.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, v. 25, p. 192–205, 1968.
- SELENICA, M.-L. B. *et al.* Diverse activation of microglia by chemokine (C-C motif) ligand 2 overexpression in brain. *J Neuroinflammation*. 17;10:86, 2013
- SESHADRI, S. *et al.* The Lifetime Risk of Stroke: Estimates From the Framingham Study. *Stroke*, v. 37, n. 2, p. 345–350, 2006.
- SIEBER, M. W. *et al.* Attenuated Inflammatory Response in Aged Mice Brains following Stroke. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, p. e26288, 2011.
- SOMMER, C. Neuronal plasticity after ischemic preconditioning and TIA-like preconditioning ischemic periods. *Acta Neuropathologica*, v. 117, n. 5, p. 511–523, 2009.
- SORIA, G. *et al.* The Ins and Outs of the BCCAO Model for Chronic Hypoperfusion: A Multimodal and Longitudinal MRI Approach. *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e74631, 2013.
- SOUZA, L.A.C; Cardiovascular effects of the central increase of Alamandine in hypertensive animals. Resumo apresentado no Congresso: XI International Symposium on Vasoactive Peptides; 2017, MG
- SRIRAM, K.; O'CALLAGHAN, J. P. Divergent Roles for Tumor Necrosis Factor- α in the Brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 2, n. 2, p. 140–153, 2007.
- STAMLER, J. S.; SLIVKA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Reviews*, v. 54, n. 1, p. 1–30, 1996.
- STEULLET, P. *et al.* A glutathione deficit alters dopamine modulation of L-type calcium channels via D2 and ryanodine receptors in neurons. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 44, n. 6, p. 1042–1054, 2008.

- STREIT, W. J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, v. 40, n. 2, p. 133–139, 2002.
- SUGAWARA, T. *et al.* Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 1, p. 209–217, 2002.
- SUMNERS, C. *et al.* Protective arms of the renin-angiotensin-system in neurological disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 40, n. 8, p. 580–588, 2013
- TER HORST, G. J. *et al.* Neuroanatomy of Cardiac Activity-regulating Circuitry: A Transneuronal Retrograde Viral Labelling Study in the Rat. *European Journal of Neuroscience*, v. 8, n. 10, p. 2029–2041, 1996.
- VILLELA, D. C.; PASSOS-SILVA, D. G.; SANTOS, R. A. S. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 23, n. 2, p. 130–134, 2014.
- WILSON, J. X.; GELB, A. W. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *Journal of neurosurgical anesthesiology*, v. 14, n. 1, p. 66–79, 2002.
- WOITZIK, J. *et al.* Comparison of different intravascular thread occlusion models for experimental stroke in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 151, n. 2, p. 224–231, 2006.
- YAMASAKI, Y. *et al.* Interleukin-1 as a Pathogenetic Mediator of Ischemic Brain Damage in Rats. *Stroke*, v. 26, n. 4, p. 676–681, 1995.
- YANG, G. *et al.* C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain research*, v. 752, n. 1–2, p. 209–218, 1997.
- YANG, R.-F. *et al.* Angiotensin-(1–7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 300, n. 1, p. C58–C64, 2011.
- YANPALLEWAR, S. Nimodipine attenuates biochemical, behavioral and histopathological alterations induced by acute transient and long-term bilateral common carotid occlusion in rats. *Pharmacological Research*, v. 49, n. 2, p. 143–150, 2004.
- YILMAZ, G.; GRANGER, D. N. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurological Research*, v. 30, n. 8, p. 783–793, 2008.
- ZEMKE, D. *et al.* Ischemia and Ischemic Tolerance in the Brain: an Overview. *NeuroToxicology*, v. 25, n. 6, p. 895–904, 2004.
- ZHENG, H.; LAPOINTE, J.; HEKIMI, S. Lifelong protection from global cerebral ischemia and reperfusion in long-lived Mcl1+/- mutants. *Experimental Neurology*, v. 223, n. 2, p. 557–565, 2010.

ZHENG, J.-L. *et al.* Angiotensin Converting Enzyme 2/Ang-(1-7)/Mas Axis Protects Brain from Ischemic Injury with a Tendency of Age-dependence. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 20, n. 5, p. 452–459, 2014.

ZIMMERMANN, C. *et al.* Antioxidant Status in Acute Stroke Patients and Patients at Stroke Risk. *European Neurology*, v. 51, n. 3, p. 157–161, 2004.

