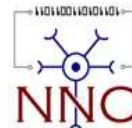


**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia**



André Luiz de Oliveira

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NEUROPROTEÇÃO
PROMOVIDA PELA ANGIOTENSINA(1-7) EM FATIAS DE
CÉREBRO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDAS À ISQUEMIA
*IN VITRO.***

Belo Horizonte

2015

André Luiz de Oliveira

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NEUROPROTEÇÃO
PROMOVIDA PELA ANGIOTENSINA(1-7) EM FATIAS DE
CÉREBRO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDAS A ISQUEMIA
*IN VITRO***

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

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Belo Horizonte

2015

043 Oliveira, André Luiz de.

Mecanismos envolvidos na neuroproteção promovida pela angiotensina (1-7) em fatias de cérebro de camundongos submetidas a isquemia in vitro [manuscrito] / André Luiz de Oliveira. - 2015.

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

Orientador: André Ricardo Massensini.

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

1. Acidentes vasculares cerebrais - Teses. 2. Isquemia cerebral - Teses. 3. Angiotensina (1-7) - Teses. 4. Neuroproteção. 5. Fisiologia - Teses. I. Massensini, André Ricardo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

**"MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NEUROPROTEÇÃO
PROMOVIDA PELA ANGIOTENSINA(1-7) EM FATIAS DE
CÉREBRO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDAS
À ISQUEMIA IN VITRO"**

ANDRÉ LUIZ DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 27 de novembro de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. RAFAELA FERNANDES DA SILVA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2015

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

“A liberdade, mais que um destino é uma possibilidade. A partir de sua propriedade real de autodeterminação o homem pode construir sua liberdade ou abandonar-se a um automatismo sonâmbulo. ”

José Antônio Marina

*aos meus pais, Eliezer e Silvina, por não terem desistido da árdua tarefa de me educar.
às minhas irmãs Lilian, Fernanda, Julhiane e Liliane, e ao meu irmão Adriano, amo muito vocês.
à todas as professoras que nortearam meu caminho e me ensinaram os primeiros passos.
... e ao Naoia Nabekura, por dar a minha vida um sentido especial.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor André Massensini, por acreditar no meu potencial e permitir que eu desse esse passo tão importante e significativo em minha vida. Gostaria de agradecê-lo pela compreensão diante das minhas limitações (que não são poucas, I´m sure). Minha vida, depois desta experiência, não será mais a mesma! obrigado por me proporcionar isso "bicho".

À todos os professores do Núcleo de Neurociências – NNC – Bruno, André, Márcio, Juliana e, especialmente, à Professora Grace pelas dicas, conselhos, risadas e por sempre incentivar a autoconfiança. E claro, não poderia me esquecer do infinitos cafés... obrigado, sinceramente.

À Gabriela, simplesmente, por TUDO! Não haveria espaço suficiente para dizer o quanto você foi importante neste trabalho. Quem mais ficaria comigo até as 4h da manhã em um laboratório, sem reclamar? Ah! Minha irmã científica! Um dos frutos deste trabalho foi sua amizade, que com muito carinho cuidarei eternamente. "Não para não, nós estamos arrasando" ... Te amo Calixberta!

Ao Fernando (o macho), por ter me dado uma força quando precisei. Por ser uma pessoa incrível, de um coração sem tamanho, capaz de fazer piada da desgraça só pra ver a gente sorrindo. Ter você, meu amigo, é ter alegria, festa e muita discussão. Chegou com esse jeitinho nordestino e conquistou todo mundo. Espero que nossa amizade dure até o mundo acabar....

À Talita... Manota, não sei nem como agradecer sua contribuição. Quando eu estava aflito, sem saber nada sobre o protocolo experimental, você foi a Luz! Admiro sua inteligência e seu caráter. Eu jamais esquecerei de todas às vezes que te liguei desesperado, e depois de três palavras suas eu simplesmente esquecia o que me perturbava. Obrigado, de coração. "a lhua vai banhar este lugar, e eu vou lembrar você".

À Rosária Aires e ao laboratório da professora Virgínia pela força nos experimentos de NO. Rô, você brilhou! Obrigado pela hombridade e pelo carinho com os quais você acolheu meu trabalho. "ficou lhindo".

Ao Flávio por ter me dado uma força (gigante) com as imagens e toda aquela "coisa de louco" que só ele entende! Flavition, obrigado mesmo cara! Principalmente por todas as vezes que balançou a cabeça e falou com muita segurança: "relaxa velho, vai dar tudo certo" ...

Ao Vini, pelos conselhos (e não foram poucos)! Como esquecer aquela balada (...)! Aprendi com você que catuaba com cerveja não é legal (rsrsr). Obrigado por me recepcionar tão bem quando cheguei ao NNC (eu nunca vou esquecer). Tenho orgulho da pessoa que você é, admiro muito sua inteligência e sua capacidade! Seja muito feliz! Obrigado, de coração.

À todos os professores e professoras do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia. A contribuição de vocês é imensurável!

Aos meus colegas e às minhas colegas do NNC e da pós-graduação. Em especial a Gabi; Fernando; Talita; Rosária; Luciana; Hyorrana (Lince Negra); Vini; Flávio; Laura; Ana Flávia; Lorena; Simões; Cristiane; Ana Raquel (querida); Léio; Hipertensão: Gisele; Juliana. Bioquímica: Flávia

À todos os alunos de iniciação científica do NNC.

À minha mãe, por me apoiar incondicionalmente e sempre ter uma palavra que me faz querer seguir, mesmo muito cansado. Ao meu pai, por entender meus defeitos, lidar com minhas inseguranças e por me chamar de filho todas as vezes que ligo pra ele. Ao meu irmão Adriano e às minhas irmãs Lilian, Fernanda, Liliane e Julhiane por serem os amores da minha vida.

Ao Naoia Nabekura por ter sido meu apoio incondicional durante todo esse trabalho. O que eu poderia dizer para agradecer-te? Acho que o silêncio bastaria, afinal você me conhecesse tão bem, que até mesmo calado, é capaz de saber o que penso. Muito obrigado por compartilhar sua vida comigo. Você, mais do que ninguém, sabe o quanto esse passo é importante pra mim, e o quanto tivemos que perder para que eu conseguisse concluir. Não tenho palavras, sinceramente, amo você!

Aos técnicos de laboratório pelo suporte. Em especial ao Taquinho pela humildade e hombridade.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG por darem o suporte financeiro necessário para que este trabalho se concretizasse. À Bioclin, que através do programa Bioclin Escola, doou os kits de LDH.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| APOIO FINANCEIRO | 3 |
| AGRADECIMENTOS | 7 |
| SUMÁRIO | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 12 |
| RESUMO | 14 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO | 16 |
| 1.2. FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL..... | 17 |
| 1.3. EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA..... | 19 |
| 1.4. DROGAS QUE PREVINEM A EXCITOTOXIDADE..... | 21 |
| 1.5. APOPTOSE | 23 |
| 1.6. ÓXIDO NÍTRICO..... | 27 |
| 1.6.1. ÓXIDO NÍTRICO E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA ISQUEMIA CEREBRAL..... | 28 |
| 1.7. SISTEMA RENINA – ANGIOTENSINA | 30 |
| 1.7.1. ANGIOTENSINA-(1-7)..... | 33 |
| 1.7.2. EFEITOS DA ANGIOTESINA-(1-7)..... | 34 |
| 1.7.3. VIAS DE SINALIZAÇÃO DA ANG-(1-7)..... | 37 |
| 1.7.4. O EIXO ECA2/ ANG-(1-7)/ MAS NO CÉREBRO | 38 |
| 1.8. FATIAS HIPOCAMPAIS SUBMETIDAS À POG (ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>) | 40 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 40 |
| 3. OBJETIVO GERAL | 41 |
| 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 41 |
| 4. MÉTODOS | 42 |
| 4.1. ANIMAIS..... | 42 |
| 4.2. DISSECAÇÃO E PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS | 42 |
| 4.3. PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (INSULTO ISQUÊMICO <i>IN VITRO</i>)..... | 43 |
| 4.4. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR..... | 43 |
| 4.4.1. LACTATO DESIDROGENASE | 43 |
| 4.4.2. ETÍDIO-HOMODÍMERO | 43 |
| 4.5. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE CELULAR..... | 45 |
| 4.5.1. EXPRESSÃO DE CASPASE-3..... | 45 |
| 4.5.2. EXPRESSÃO DE CASPASE-8..... | 45 |
| 4.5.3. EXPRESSÃO DE CASPASE-9..... | 46 |
| 4.6. ENSAIO PARA QUANTIFICAR A LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO | 46 |
| 4.7. ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO..... | 47 |
| 4.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 48 |
| 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 48 |
| 5. RESULTADOS | 49 |
| 5.1. ANG-(1-7) REDUZ A MORTE CELULAR EM FATIAS DE HIPOCAMPO SUBMETIDAS À ISQUEMIA <i>IN VITRO</i> . 49 | |

| | |
|--|-----------|
| 5.2. CASPASES..... | 51 |
| 5.2.1. <i>Expressão de caspase-8</i> | 51 |
| <i>Expressão de caspase-9</i> | 52 |
| 5.2.2..... | 52 |
| 5.2.3. <i>Expressão de caspase-3</i> | 53 |
| 5.3. NÍVEIS DE NITRITO [NO ₂ ⁻] | 54 |
| 5.4. LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO..... | 55 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 57 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 65 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 66 |
| 9. APÊNDICE..... | 76 |
| 9.1. Apêndice 1..... | 76 |
| 9.2. Apêndice 2..... | 77 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1 | ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS EVENTOS FISIOPATOLÓGICOS NA ISQUEMIA CEREBRAL. | 19 |
| FIGURA 2 | REPRESENTAÇÃO DAS VIAS DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS. | 26 |
| FIGURA 3 | ESQUEMA DA DUALIDADE FUNCIONAL DO NO NA ISQUEMIA CEREBRAL..... | 30 |
| FIGURA 4 | MODELO SIMPLIFICADO DO SRA..... | 32 |
| FIGURA 5 | PRINCIPAIS AÇÕES NÃO-CARDIOVASCULARES DA ANG-(1-7) VIA RECEPTOR MAS EM DIFERENTES TECIDOS E PROCESSOS. | 36 |
| FIGURA 6 | MODELO DE SINALIZAÇÃO DA ANG-(1-7)/MAS. | 38 |
| FIGURA 7 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL. O ENSAIOS DE CASPASE E VIABILIDADE CELULAR FORAM REALIZADOS APÓS A REPERFUSÃO. OS ENSAIOS PARA GLUTAMATO E NITRITO FORAM REALIZADOS LOGO APÓS A ISQUEMIA. | 48 |
| FIGURA 8 | EFEITO DA ANG-(1-7) SOB A VIABILIDADE CELULAR DE FATIAS DE HIPOCAMPO SUBMETIDAS À ISQUEMIA <i>IN VITRO</i> | 50 |
| FIGURA 9 | VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE HIPOCAMPO APÓS ISQUEMIA <i>IN VITRO</i> | 51 |
| FIGURA 10 | EFEITO DA ANG-(1-7) SOBRE A EXPRESSÃO DE CASPASE-8 ATIVA EM FATIAS DE HIPOCAMPO APÓS ISQUEMIA <i>IN VITRO</i> | 52 |
| FIGURA 11 | EXPRESSÃO DE CASPASE-9 ATIVA EM FATIAS DE HIPOCAMPO, APÓS ISQUEMIA <i>IN VITRO</i> | 53 |
| FIGURA 12 | FIGURA X. EFEITO DA ANG-(1-7) SOB A EXPRESSÃO DE CASPASE-3 ATIVA EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE CAMUNDOGOS APÓS ISQUEMIA <i>IN VITRO</i> | 54 |
| FIGURA 13 | EFEITO DA ANG-(1-7) SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE NITRITO [NO ₂]. | 55 |
| FIGURA 14 | EFEITO DA ANG-(1-7) SOBRE A LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO. | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| ACSF | Fluido Cérebro Espinhal Artificial |
| ACTH | Hormônio Adrenocorticotrófico |
| AIF | Fator Indutor de Apoptose |
| AKT | Proteína Quinase Serina/Treonina |
| AMPA | α -amino-3- hidroxil-5-metil-4-isoxazol-ácido ropiônico |
| Apaf-1 | Fator de Ativação de Protease |
| AVC | Acidente Vascular Cerebral |
| Bcl-2 | Linfoma de Células B - 2 |
| BDNF | Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro |
| Caspase | Cysteine-Aspartic-Acid-Proteases |
| CREB | Proteína Ligante ao Elemento Responsivo ao AMPc |
| DAG | Diacilglicerol |
| DISC | Complexo de Sinalização Indutor de Morte |
| EndoG | Endonuclease G |
| eNOS | Óxido Nítrico Sintase Endotelial |
| EthD-1 | Etídio Homedímero |
| FADD | Proteína de Domínio de Morte Associada |
| FAS-L | Ligante da Proteína de Membrana Fas. |
| GABA | Acido Gama-Aminobutírico |
| GDH | Glutamato Desidrogenase |
| GDNF | Fator Neurotrófico Derivado Da Glia |
| IAP | Proteína Inibidora de Apoptose |
| IETD-AFC | ile-glu-thr-asp - 7-amino-4-trifluorometil cumarim |

| | |
|-------------|--|
| iNOS | Óxido Nítrico Sintase Induzível |
| IP3 | Inositol 1,4,5-trifosfato |
| KRH | Krebs-ringer- HEPES |
| LEHD-pNA | Ac-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroanalide |
| LTP | Potenciação de Longa Duração |
| NADP | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato |
| NGF | Fator de Crescimento Nervoso |
| NMDA | N-Metil-D-Aspartato |
| NOS | Óxido Nítrico Sintase |
| nNOS | Óxido Nítrico Sintase Neuronal |
| PB | Solução Tampão Fosfato |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3 Quinase |
| PKC | Proteína Quinase C |
| SMAC/DIABLO | Segundo Ativador de Caspase Derivado da Mitocôndria / Inibidor Direto de Proteínas Inibidoras de Apoptose. |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| Z-DEVD-AMC | asp-glu-val-asp - 7-amino-4-metilcumarim |

RESUMO

A isquemia cerebral resulta em uma cascata de eventos metabólicos deletérios que causam importantes alterações celulares. Isto inclui rápida diminuição de ATP, liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, perda da homeostase iônica, excitotoxicidade, ativação de enzimas e disfunção mitocondrial. A demonstração de que a Ang-(1-7) é um componente chave do SRA, representa uma das mais importantes mudanças conceituais neste importante sistema hormonal. O eixo ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas, constitui um eixo alternativo que possui mecanismos intrínsecos para induzir ações que antagonizam aquelas do eixo ECA/Ang.II/Receptor Mas, produzindo assim muitos efeitos benéficos. Estudos recentes sugerem que Ang-(1-7) possui papel neuroprotetor, porém os mecanismos envolvidos ainda não foram completamente esclarecidos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo investigar os possíveis mecanismos envolvidos na neuroproteção promovida pela Ang-(1-7)/Mas, em um modelo de isquemia *in vitro* utilizando o protocolo de Privação de Oxigênio e Glicose (POG). Foram utilizados camundongos machos swiss; com idade entre 7-8 semanas. Todos os animais passaram por procedimento de eutanásia (deslocamento cervical) e tiveram o cérebro rapidamente removido e o hipocampo dissecado. Foram providenciadas fatias de hipocampo e divididas em grupos testes e controles com Ang-(1-7) e antagonista do receptor Mas – A-779. Após a POG foram realizados: ensaio de viabilidade celular, quantificação de glutamato liberado, quantificação de nitrito liberado e atividade de caspases: 3, 8 e 9. Para análise estatística utilizou-se *Two-way ANOVA* e pós-teste *Bonferroni*. Nossos resultados mostraram que Ang-(1-7) foi capaz de proteger as fatias hipocámpais submetidas à isquemia *in-vitro*. Como possível mecanismo protetor, observamos que o tratamento com Ang-(1-7) reduziu a liberação de glutamato, o que pode influenciar mecanismos de excitotoxicidade. Além disso, nosso trabalho também mostrou que o tratamento com Ang-(1-7) reduziu a liberação de óxido nítrico após o insulto isquêmico e diminuiu a atividade de moléculas pró-apoptóticas, aumentando portanto a viabilidade celular.

Palavras-chaves: Angiotensina-(1-7), Neuroproteção, AVC

ABSTRACT

Cerebral ischemia results in a cascade of metabolic deleterious events that cause important cellular changes. This includes rapid depletion of ATP, Ca^{2+} release from intracellular stores, loss of ionic homeostasis, excitotoxicity, enzyme activation and mitochondrial dysfunction. The demonstration that Ang (1-7) is a key component of the RAS represents a major conceptual change in this important hormonal system. The ACE2 / Ang- (1-7) / Mas axis constitutes an alternative axis having intrinsic mechanisms to induce those which antagonize the actions ACE / Ang.II /AT1R, thus producing many beneficial effects. Recent studies suggest that Ang-(1-7) have neuroprotective role, though the events involved in this mechanism have not been fully clarified. This work aims to investigate the possible mechanisms involved in neuroprotection promoted by Ang (1-7)/Mas in an *in vitro* model of ischemia using the oxygen and glucose deprivation protocol (OGD). Swiss male mice 7-8 weeks age were used. All animals underwent euthanasia procedure (cervical dislocation) and had the brains quickly removed and hippocampus dissected. Hippocampal slices were divided into OGD and nOGD (control) groups incubated with Ang (1-7) and A-779 Mas receptor antagonist. After OGD period, we performed cell viability assay, glutamate released quantification, nitrite released quantification and caspase 3, 8, 9 activity. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc*. Our results showed that Ang-(1-7) was able to protect hippocampal slices submitted to *in-vitro* ischemia. As a possible protective mechanism, we observed that the treatment with Ang- (1-7) reduced the glutamate released, which can influence excitotoxic mechanisms. In addition, our work also showed that treatment with Ang- (1-7) decreased nitric oxide release after ischemic insult and decreased the pro-apoptotic molecules activity (caspase 3 and 8), carrying increasing cell viability.

Keywords: Angiotensin-(1-7), Neuroprotection, Stroke

1.INTRODUÇÃO

1.1.ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE), ou ainda Acidente Vascular Cerebral (AVC) é o equivalente do termo genérico inglês *stroke*, que descreve apenas o comprometimento neurológico funcional (CHAVES, 2000).

O AVC pode ser definido como uma síndrome clínica de origem vascular, caracterizada pelo déficit neurológico agudo (focal ou global), que leva ao aparecimento rápido de sinais e sintomas com duração superior à 24 horas (MARKUS, 2012; MUIR, 2013).

As causas do AVC, e por sua vez seus subtipos patológicos são: anóxico-isquêmico e hemorrágico. Classicamente, o tipo anóxico-isquêmico é dividido em três categorias, de acordo com o mecanismo pelo qual ocorre a lesão cerebral, são eles: lacunares, ateroscleróticos e embólicos. Este subtipo de AVC é caracterizado pela falência vasogênica para suprir adequadamente os tecidos cerebrais com oxigênio e substratos. Em contrapartida, o tipo hemorrágico caracteriza-se pelo extravasamento de sangue para dentro ou para o entorno das estruturas cerebrais. Este por sua vez pode ser dividido em duas categorias (intraparenquimatoso ou subaracnóide), de acordo com a região lesada (CHAVES, 2000; SACCO et al., 2006)

O AVC é terceira maior causa de morte no mundo, e a primeira maior causa de deficiência neurológica. A incidência desta doença aumenta, exponencialmente com a idade, e estudos apontam que 20% dos homens e 25% das mulheres tem grandes chances de sofrer um AVC após 85 anos de idade (MARKUS, 2012). Entretanto o AVC pode ocorrer mais precocemente e ser relacionado à outros fatores de risco como, distúrbios da coagulação, doenças inflamatórias e imunológicas (SIQUEIRA NETO et al., 1996).

O AVC isquêmico é cerca de quatro vezes mais comum (61%-86%) do que o tipo hemorrágico, sendo a aterotrombose a causa mais comum. Os fatores de risco mais prevalentes nessas condições são: hipertensão arterial e tabagismo (ZETOLA et al., 2001).

A identificação de fatores de risco (modificáveis, não modificáveis e ambientais), deve ter prioridade nas atividades de combate e controle dos AVC's, pois permite uma redução significativa da incidência e recidiva da patologia (PIRES et al., 2004)

1.2. FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL

O tecido cerebral possui uma demanda energética elevada em função da manutenção dos gradientes iônicos e dos potenciais de repouso de membrana celular (BK; LJUNGGREN, 1973; SIESJÖ, 1992).

Em condições normais, os substratos energéticos do tecido cerebral são glicose e oxigênio, e os produtos metabólicos são dióxido de carbono e água. O tecido cerebral utiliza obrigatoriamente glicose como substrato energético, e apesar de ser relativamente, pequeno (2% do peso corporal) o cérebro utiliza grandes quantidades de oxigênio (20%) e glicose (25%) do total corporal. Isso representa cerca de 15% do débito cardíaco (MAGISTRETTI et al., 1996).

Embora o tecido cerebral possua uma circulação colateral desenvolvida, a alta demanda energética, aliada aos baixos estoques, o torna susceptível às alterações no suprimento de oxigênio e glicose. Uma interrupção no fornecimento destes substratos por 5-8 minutos pode acarretar danos neurais irreversíveis (LJUNGGREN et al., 1974; DIAS COLLI, BENEDICTO OSCAR, COUTINHO NETTO, JOAQUIM, LACHAT, JOAO JOSE, 2000).

O dano provocado pela isquemia cerebral tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores, com ênfase nos mecanismos pelos quais este é gerado. Dentre muitos mecanismos já relatados, a acidose láctica; o influxo de cálcio;

excitotoxicidade glutamatérgica e formação de radicais livres, são os de maior relevância atualmente (SCHURR et al., 1996; JIANG et al., 2014; ZHENG, J L et al., 2014).

A morte celular isquêmica é iniciada por alterações na fosforilação oxidativa que resulta em uma série de processos metabólicos deletérios. Estes processos incluem, diminuição do pH e ATP; aumento da produção de radicais livres pela mitocôndria; aumento do influxo de Na^+ e despolarização da membrana em função da perda de ATP por falha na atividade da Na^+/K^+ - ATPase (LIPTON, 1999). À este ponto, despolarizações de membrana ocorrem sucessivamente liberando mais neurotransmissores excitatórios, como o glutamato. A hiperexcitabilidade glutamatérgica faz com que o Mg^{2+} que bloqueava canais voltagem-dependentes NMDA, seja deslocado, aumentando a despolarização e permitindo consequentemente, o influxo de Ca^{2+} . Outros receptores como AMPA e Cainato também são ativados, desta forma o influxo de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- e obrigatoriamente água aumenta através do gradiente osmótico, levando ao edema e lise celular (ZEEVALK; NICKLAS, 1992; LIPTON, 1999). (Figura 1)

A abertura sustentada e concomitante de canais para Ca^{2+} potencializa o processo de hiperexcitabilidade, fazendo com que o metabolismo mitocondrial seja interrompido, criando um ciclo vicioso. Este processo se propaga e área lesada aumenta progressivamente, pela ativação de proteases, nucleases, fofolipases, oxido nítrico sintase e outras enzimas degradativas, aumentando a produção de radicais livres (SIESJÖ, 1992; LIPTON, 1999).

O insulto isquêmico não pode ser entendido através de único mecanismo, mas sim como um processo dinâmico. Os eventos que ocorrem após a isquemia cerebral resultam em excitotoxicidade, acidose láctica, apoptose, produção de radicais livres e morte progressiva, todos estes colaboram para o aumento do volume de infarto, tão logo o processo isquêmico comece (CASTELLANOS et al., 2002; THOMAZI et al., 2008).

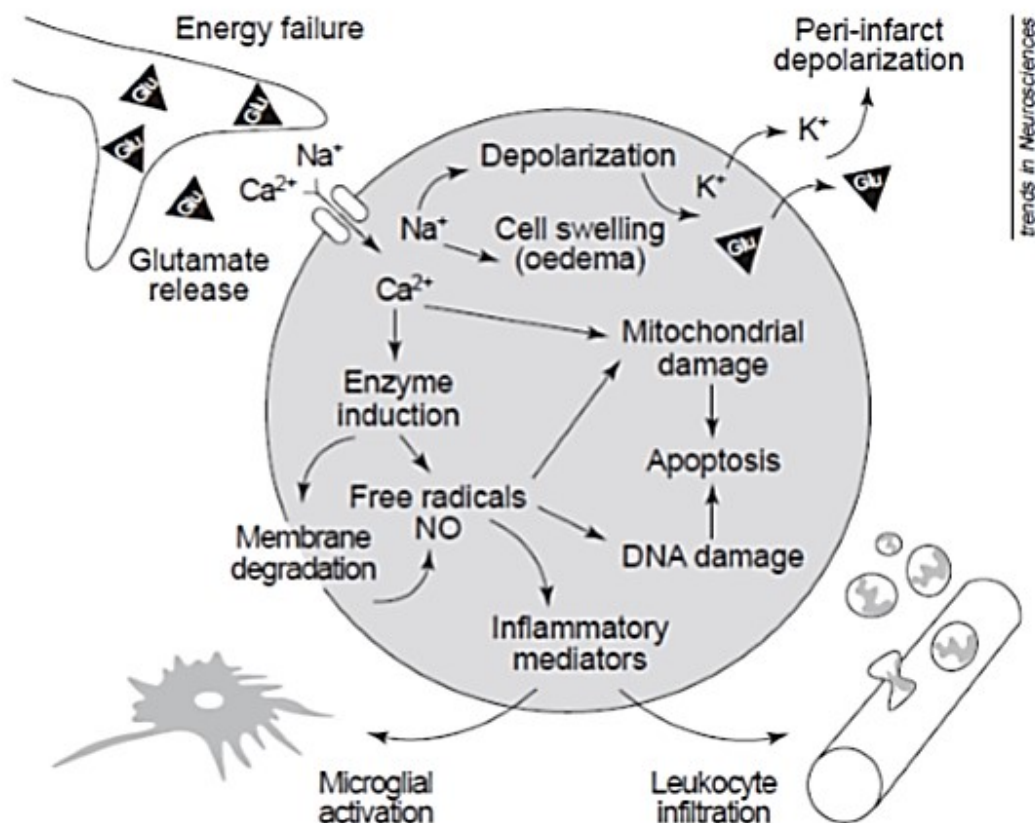


FIGURA 1 Ilustração esquemática dos eventos fisiopatológicos na isquemia cerebral.

A falha energética decorrente da isquemia cerebral leva a despolarização dos neurônios. O glutamato é então depositado na fenda sináptica estimulando excessivamente receptores específicos glutamatérgicos. Essa estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos (excitotoxicidade) aumenta os níveis de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- no interior da célula, e K^+ no meio extracelular. Os níveis intracelulares elevados de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- rompe o equilíbrio osmótico provocando o edema celular. Além disso o Ca^{2+} , importante mensageiro intracelular, superestimula cascatas enzimáticas (proteases, lipases, endonucleases etc.), que desencadeiam maior liberação de radicais livres, que por sua vez causam danos ao DNA, mitocôndria e membranas, iniciando processo apoptótico. Os radicais livres também ativam mediadores inflamatórios e levam a infiltração de células do sistema imune (DIRNAGL et al., 1999).

1.3. EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

O Glutamato é o neurotransmissor excitatório (aminoácido), mais abundante no cérebro, identificado pela primeira vez em 1960 (CURTIS; WATKINS, 1961).

A síntese do glutamato pode ser à partir da glicose (ciclo de Krebs) através transaminação do α -cetoglutarato, ou pode ser sintetizado a partir da glutamina processada pelas células gliais. Neste caso as células gliais recaptam o glutamato liberado no terminal sináptico e o converte em glutamina, que posteriormente sofre ação enzimática (glutaminase), e então é convertida novamente em glutamato. A síntese do glutamato envolve outras enzimas tais como: glutamato sintase e ornitina. Uma vez sintetizado o glutamato pode ser armazenado em vesículas no terminal sináptico, ou ser mantido livre no citoplasma (BRADFORD et al., 1978; FONNUM, 1984)

A liberação do glutamato no terminal sináptico pode ser dependente de Ca^{2+} , provocando exocitose de vesículas sinápticas, ou independentes de Ca^{2+} , através da reversão da captação. Este fenômeno ocorre quando há hipóxia/anóxia, onde a liberação vesicular é inibida devido à liberação de adenosina, que reduz o influxo pré-sináptico de Ca^{2+} . A reversão da captação também ocorre quando há aumento das concentrações de K^+ extracelular, que despolariza as células vizinhas e aumenta as concentrações intracelulares de Na^+ (SIESJÖ et al., 1990; DANBOLT, 2001)

Os receptores de glutamato se dividem em dois grandes grupos à saber: receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são acoplados à canais iônicos e são divididos em três tipos, AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico), NMDA (N-metil-D-aspartato) e Cainato. Os receptores metabotrópicos são acoplados a proteína G e agem via segundo mensageiro. Eles podem ser divididos em tipo: I, II e III (HOLLMANN et al., 1994; VIGNES et al., 1997)

Transportadores de alta afinidade localizados nos neurônios adjacentes e nas células gliais, rapidamente removem o glutamato liberado no terminal sináptico, prevenindo a morte celular, já que a quantidade de glutamato liberado é substancialmente maior do que a necessária para ativação dos receptores (DANBOLT, 2001; SWANSON et al., 2005).

Durante a isquemia, há uma excessiva liberação de glutamato e uma hiperestimulação de seus receptores. Este último desempenha várias funções associadas ao metabolismo celular incluindo, necrose e apoptose (MOURÃO et al., 2014)

Um evento particular dos neurônios é a excitotoxicidade glutamatérgica. Neste caso a toxicidade é causada pela excessiva estimulação dos receptores NMDA neuronais. Isto acontece devido a falta de ATP, que ocorre durante a isquemia cerebral, por exemplo. A perda de ATP causa uma despolarização generalizada no neurônios, fazendo com que mais neurotransmissores sejam liberados, sem contudo, haver energia suficiente para recaptção. O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro, isso justifica a hiperestimulação dos receptores NMDA. Quando há hiperestimulação de receptores glutamatérgicos (NMDA), ocorre um grande influxo de Ca^{2+} no neurônio, então a mitocôndria e retículo endoplasmático captam o Ca^{2+} citoplasmático, porém se essa entrada de íons é excessiva, ocorre estresse destas organelas que iniciam o processo apoptótico (GORMAN, 2008).

Os receptores NMDA localizam-se na membrana pós sináptica, e exibem maior permeabilidade ao Ca^{2+} do que os receptores AMPA e KA, esta característica lhes confere um papel mais ativo em processos neurotóxicos. Em repouso, os receptores NMDA são fisiologicamente, bloqueados por um íon Mg^{2+} que impede o fluxo de Ca^{2+} . No entanto, sob despolarização (que pode ocorrer pela ativação dos receptores AMPA), o Mg^{2+} é removido, e o canal liberado permitindo o influxo de Ca^{2+} (RUGGIERO et al., 2011).

1.4. DROGAS QUE PREVINEM A EXCITOTOXIDADE

Para o desempenho de funções normais, o citosol da maioria das células requer uma intrincada regulação das concentrações de Ca^{2+} , na faixa de 50-300nm. Isso é possível graças a integridade da membrana, que mantém o equilíbrio iônico

intra e extracelular, e à grandes organelas intracelulares que armazenam Ca^{2+} . O desequilíbrio da regulação de Ca^{2+} portanto, pode levar a grandes prejuízos, acarretando inclusive morte celular (CHOI, 1988).

A isquemia cerebral provoca despolarização neuronal, justamente por interromper o equilíbrio iônico, outrora mantido sob alta demanda energética. Esse evento, como já relatado, libera grandes quantidades de Glutamato na fenda sináptica, iniciando um ciclo vicioso de excitotoxicidade (CHOI, 1988).

Atualmente é aceito que todos os subtipos de receptores de glutamato, de alguma maneira, participam da excitotoxicidade. Contudo os subtipos iGluRs são reconhecidamente, mais importantes pela estreita relação entre influxo de Ca^{2+} e a injúria neuronal, ambos iniciados a partir da estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos. Neste sentido, as pesquisas iniciais abordavam o bloqueio dos receptores glutamatérgicos, demonstrando inclusive o seu papel neuroprotetor, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Contudo, o emprego de antagonistas glutamatérgicos interfere negativamente no funcionamento normal do cérebro, produzindo efeitos colaterais. Os antagonistas mais estudados para o NMDA são MK-801, a memantina e a gaciclidina (GK-11). Dentre eles, o que possui maior afinidade para o receptor NMDA é o MK-801, contudo doses efetivas deste antagonista pode provocar danos em regiões corticolímbicas. Desde 2003, a FDA aprovou o uso da memantina no tratamento da doença de Alzheimer, na tentativa de evitar perdas cognitivas em estágios moderados e severos. Por fim, o GK-11 é menos neurotóxico do que seus concorrentes, tornando-o promissor na busca por substâncias neuroprotetoras. (Ruggiero et al. 2011; Olney et al. 1989).

Alguns anestésicos, incluindo os voláteis, como o halotano, sevoflurano e isoflurano; os barbitúricos como o tiopental e pentobarbital; e o propofol, apresentam efeito neuroprotetor em modelos de lesão isquêmica aguda, porém não são capazes de manter esse efeito após muitas horas ou dias. A justificativa para esse efeito seria a potencialização da transmissão GABAérgica, mediação dos receptores NMDA e AMPA e conseqüentemente redução do influxo de Ca^{2+} (KRAUSE et al., 2004; RUGGIERO et al., 2011).

Existem muitas drogas que através de mecanismos distintos promovem neuroproteção. Contudo nenhuma droga ou esquema politerapêutico conseguiu bloquear a morte de neurônios decorrentes de estímulos, tal como isquemia cerebral.

1.5. APOPTOSE

Apoptose é um mecanismo programado de morte celular, que desempenha um papel essencialmente, importante no desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares. Alterações nas vias da apoptose podem levar a doenças neurodegenerativas, autoimunes, e câncer (THOMPSON, 1995).

Os eventos apoptóticos seguem uma sequência organizada, sendo que nas células de mamíferos a morte celular pode ser iniciada tanto por uma via intrínseca, mediada pela mitocôndria, quanto por uma via extrínseca através de receptores de morte (KRAMMER et al., 2007; SCHLEICH; LAVRIK, 2013).

A apoptose está associada com a ativação de Caspases (cysteine-aspartic-acid-proteases) – proteases que clivam uma enorme variedade de substratos proteicos, provocando a degradação e morte da célula. Estas enzimas possuem resíduos de cisteína, e clivam outras proteínas após um resíduo de ácido aspártico. Esta característica garante especificidade incomum entre as proteases (THORNBERRY et al., 1992; GORMAN, 2008).

Atualmente, 11 tipos de caspases foram identificados em humanos, caspases 1-10 e caspase 14. Todas elas são sintetizadas na forma de pro-enzimas inativas e contêm um pro-domínio grande (20 subunidades) e um pequeno (17 subunidades). A ativação destas pro-enzimas ocorre através de uma cascata de clivagem, onde culmina na remoção do pró-domínio (ALNEMRI, 1997; DEGTEREV et al., 2003).

As caspases podem ser classificadas, de acordo com a função que desempenham nos eventos apoptóticos, em ativadoras e executoras. Proteínas ativadoras, tais como: capase 8 e capase 9, clivam pro-formas inativas de caspases executoras (capase 3 e caspase 7). As caspases compartilham similaridades na sequência de aminoácidos, estrutura e especificidade a substratos (THORNBERRY, 1999; DEGTEREV et al., 2003).

Como dito anteriormente, existem duas vias de sinalização apoptótica descritas, a intrínseca (mitocondrial) e a extrínseca (receptor de morte). Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (ROCHA, 2007).

Na via intrínseca, a ativação de caspases efetoras é desencadeada pela liberação de citocromo C da mitocôndria para o citoplasma, o qual se associa com Apaf-1 e pro-caspase 9, na presença de ATP ou dATP, formando um grande complexo proteico, o apoptossoma, que promove o recrutamento de pro-caspase-9, seguido da ativação da caspase-9, e esta por sua vez cliva e ativa caspase-3 (EKERT; VAUX, 2005). Outros fatores pro-apoptóticos tais com, Smac/Diablo e AIF (apoptosis-inducing-factor), também são liberados pela mitocôndria durante o processo de morte programada. Um desses fatores – a AIF, pode induzir a condensação nuclear, independente de caspase, de fato a via de sinalização de morte celular nos neurônios, nem sempre depende da ativação de caspase. Por fim, a via intrínseca por ser estimulada por vários fatores, dentre eles se destacam estresse oxidativo e excitotoxicidade glutamatérgica (LI et al., 2001; DEGTEREV et al., 2003).

A via extrínseca de sinalização apoptótica é iniciada quando um ligante de morte interage com um receptor da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral, rTNF que inclui: rTNFR-1, Fas/CD95 e TRAIL. Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (ROCHA, 2007). Os receptores da família

rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite reconhecer com especificidade seu ligante, levando a trimerização do receptor e conseqüentemente sua ativação. À partir desta fase a sinalização é feita pela porção intracelular do receptor, que contém uma sequência de 65 aminoácidos, conhecida também como “domínio de morte”. Quando a interação ligante-receptor de morte é bem sucedida, os domínios de morte então interagem com outras moléculas (FADD/MORT-1), que recrutam caspase-8, formando um complexo proteico (DISC), capaz de clivar e ativar caspase-3 (HARA; SNYDER, 2007; ROCHA, 2007).

O mecanismo apoptótico possui vários outros pontos de regulação. A integridade da mitocôndria e por conseqüência, toda a via intrínseca, também é regulada pela família de moléculas Bcl-2. Esta família inclui tanto moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bak), quanto moléculas anti-apoptóticas (Bcl2, Bcl-xl), as quais atuam inibindo ou promovendo a liberação de fatores pro-apoptóticos no citoplasma. Além disso, a cascata de eventos que envolve a liberação de citocromo C e ativação de caspases, também é regulada por uma família de proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (GORMAN, 2008) (figura 2).

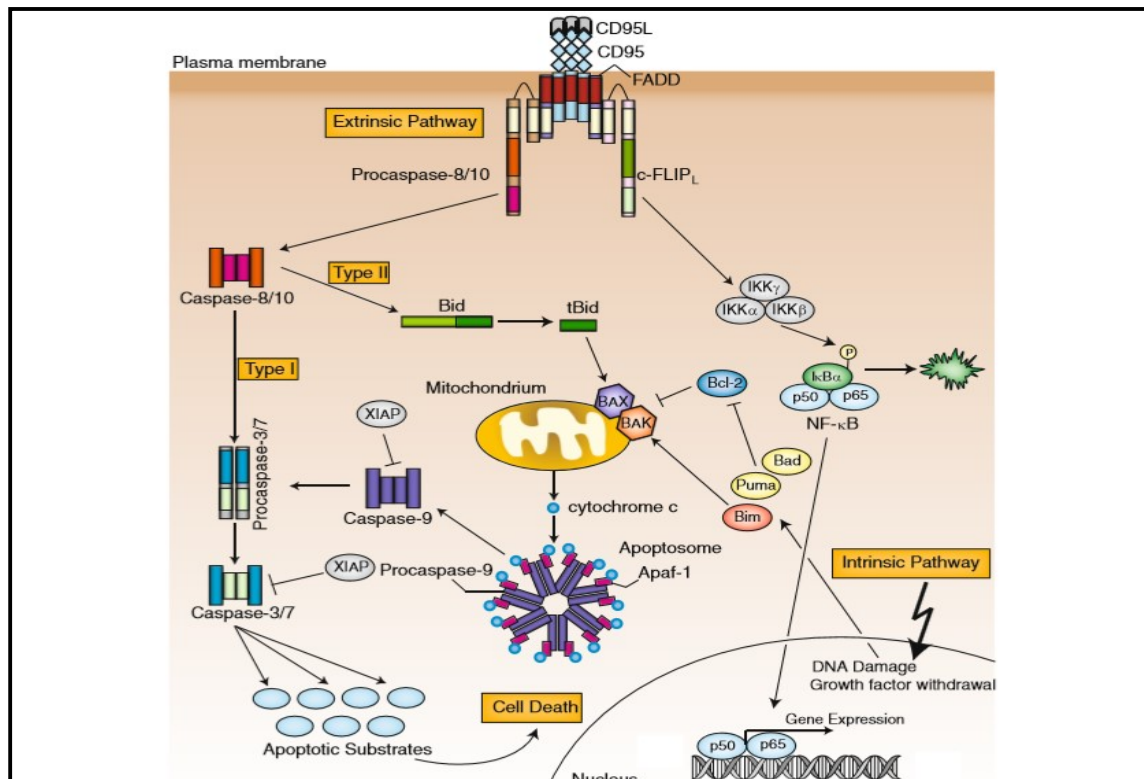


FIGURA 2 Representação das vias de apoptose em células de mamíferos.

A apoptose pode ser induzida por um estímulo extracelular (extrínseco) ou intracelular (intrínseco). A via extrínseca é iniciada pela estimulação dos DRs (CD95 ou TRAIL-R), localizados na membrana celular. A estimulação de CD 95 resulta no recrutamento de diferentes proteínas, incluindo FADD, procaspase-8, procaspase-10 e c-FLIP, os quais formam um complexo sinalizador de morte (DISC, sigla em inglês). A procaspase-8 é ativada no DISC, o qual é regulado por proteínas c-FLIP. A caspase-8 ativa cliva e ativa caspases efetoras – caspase-3 e -7, e/ou proteínas da família Bcl-2 (Bid). A bid ativada então é translocada para a mitocôndria, aumentando assim a permeabilidade da membrana externa mitocondrial (MOMP), promovendo também a liberação de citocromo c, bem como outras proteínas pró-apoptóticas para o citosol. O citocromo c está envolvido na formação do apoptossoma e ativação de procaspase-9. A procaspase-9 também ativa procaspase-3 e -7 resultando em alta atividade e morte. A sinalização pelo CD95 é distinta em dois tipos de célula. Células tipo I ativam, eficientemente, caspase-8 e subsequentemente, caspases efetoras, sem aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial induzida por tBid. Células tipo II, contudo, formam pouco DISC e portanto dependem da amplificação mediada por tBid-MOMP. Além disso, CD95 pode iniciar vias não-apoptóticas, como NF-κB ou MAPK na sobrevivência celular. A via intrínseca pode ser iniciada por vários estímulos, incluindo dano ao DNA ou fator de crescimento e níveis elevados de Ca^{2+} . A apoptose é rigorosamente controlada pela mitocôndria e proteínas da família Bcl-2. Adaptado de Schleich & Lavrik 2013.

1.6. ÓXIDO NÍTRICO

Hipóxia e isquemia cerebral tem recebido grande atenção atualmente, por serem fatores críticos em muitas doenças do SNC, incluindo AVC e hipóxia neonatal. Ao longo de 20 anos vários conceitos foram introduzidos pela ciência a fim de elucidar o papel do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia de doenças cerebrais, incluindo substâncias neurotóxicas, resposta inflamatória, apoptose e excitotoxicidade (DOYLE et al., 2008). Estudos mostraram que o NO também transmite sinais neuronais no SNC, e participa de respostas inflamatórias (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2011). Como radical livre, o NO pode quebrar diretamente estruturas proteicas, levar ao dano mitocondrial e induzir apoptose. Em particular, a produção excessiva de NO é neurotóxica e estimula necrose neuronal (ZHANG et al., 2013). O NO endógeno, em mamíferos é formado basicamente, pela conversão de L-arginina e oxigênio, em L-citrulina e NO, pela ação de três isoformas de Óxido Nítrico Sintase (NOS, sigla em inglês): NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS). A estrutura da NOS envolve dois domínios estruturais: o domínio c-terminal (redutase) e o domínio N-terminal (oxigenase) (FORSTERMANN; SESSA, 2012). O domínio N-terminal possui atividade oxidativa e contém sítio de ligação para heme, (6R)5, 6, 7, 8 –tetrahydro-l-biopterina (BH4), e L-arginina. O domínio C-terminal redutase contém sítios de ligação para flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) (ALDERTON et al., 2001). Todas as três formas isoformas de NOS utilizam L-arginina e oxigênio como substrato, além de requererem co-fatores como, NADPH, FAD, FMN E BH4 (FORSTERMANN; SESSA, 2012).

No cérebro saudável, a maior parte do NO produzido ocorre através da isoforma constitutiva nNOS nos neurônios e eNOS no endotélio. Contudo, já é discutido atualmente que as células do SNC podem expressar as três isoformas de NOS (BROWN, 2010). Além disso, a isoforma iNOS participa de processos inflamatórios e está diretamente envolvida na fisiopatologia de doenças do SNC,

sendo expressa primariamente em macrófagos, micróglia, neutrófilos e neurônios, gerando altos níveis de NO (ZHU et al., 2014).

1.6.1. ÓXIDO NÍTRICO E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA ISQUEMIA CEREBRAL

Já é estabelecido na literatura que o insulto isquêmico altera a atividade e a expressão das NOS, e que os efeitos do óxido nítrico na fisiopatologia da isquemia cerebral podem ser benéficos ou tóxicos dependendo da isoforma da NOS, do tipo de célula que o produziu, e do estágio do processo isquêmico. Além disso, cada isoforma de NOS e o NO produzido por elas pode desempenhar funções diferentes no processo isquêmico cerebral (LIU et al., 2015) (figura 3).

Muitos autores concordam que a expressão de nNOS encontra-se aumentada nos estágios iniciais da isquemia/hipóxia cerebral, acompanhada de uma larga produção de NO. Além disso, a supressão da atividade de nNOS diminui a morte celular na isquemia cerebral. Isso sugere que o NO produzido pelo nNOS pode aumentar o dano causado pela isquemia cerebral, especialmente nos estágios iniciais. (KOH, 2008; LIU et al., 2015)

Em diferentes modelos de insulto isquêmico, como por exemplo: oclusão da artéria cerebral média e privação de oxigênio e glicose, a expressão de iNOS está aumentada no cérebro, o qual produz grandes quantidade de NO. Além disso a indução da atividade de iNOS exerce efeitos deletérios e parece ser um mediador chave na fisiopatologia da isquemia cerebral, uma vez que nestas condições são produzidas quantidades excessivas de NO. Contudo, NO derivado da isoforma iNOS também pode exercer efeitos protetores. Alguns estudos mostram que a expressão de iNOS em áreas específicas do cérebro induzem neurogênese (IADECOLA et al., 1995; LIU et al., 2015). Segundo HARA; SNYDER, (2007), estas discrepâncias podem estar relacionais com as concentrações de NO, bem como formação diferencial de radicais livres; nitrito ou nitrato.

O NO produzido pela isoforma eNOS, predominantemente encontrada no endotélio, tem sido considerado neuroprotetor, uma vez que o aumento da expressão de eNOS nos estágios iniciais da isquemia cerebral melhora o aporte sanguíneo e conseqüentemente a sobrevivência celular (LIPTON, 1999; JIANG et al., 2014).

A manipulação de peptídeos vasoativos, em especial os do SRA, tem demonstrado grande relevância no estudo da patogênese de diversas alterações vasculares e neurológicas, ao regular a expressão de NOS e a síntese de NO. Cerrato et al., 2012 demonstraram, por exemplo, que a injeção intrahipotalâmica de Ang-(1-7) aumenta a expressão de NOS em ratos hipertensos. Além disso o SRA, através da Ang-(1-7), pode prevenir a morte neuronal associada ao estresse oxidativo (JIANG, TENG et al., 2013).

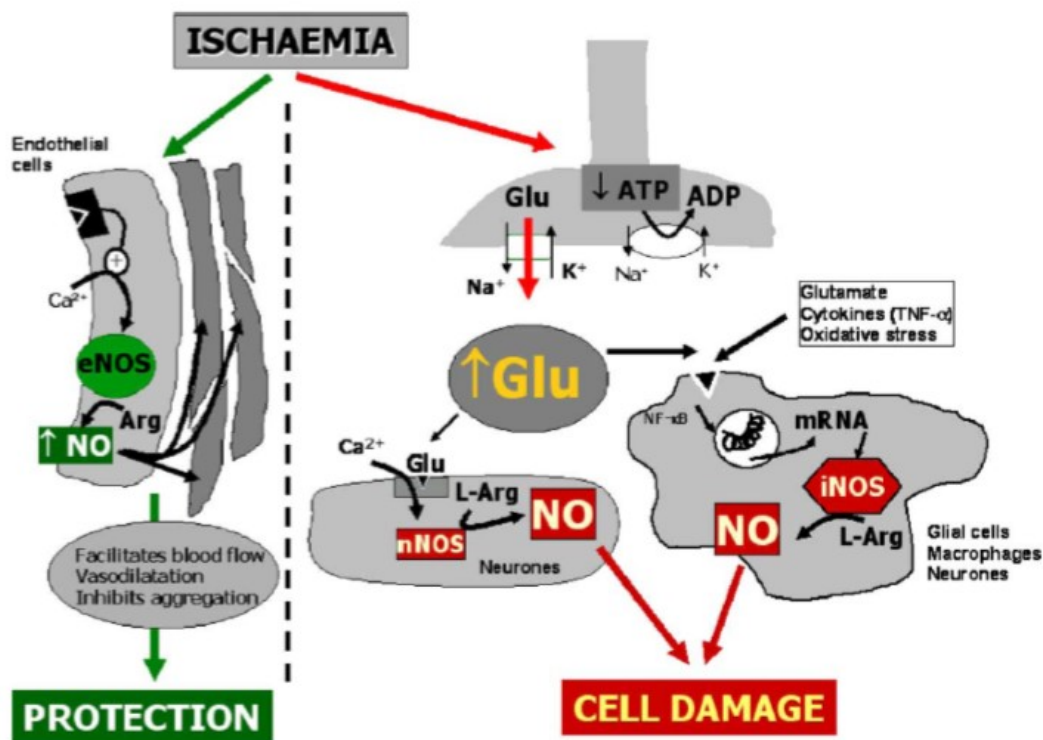


FIGURA 3 Esquema da dualidade funcional do NO na isquemia cerebral.

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por uma enzima Ca^{2+} - dependente. Na isquemia cerebral, os níveis de Ca^{2+} estão elevados no meio intracelular, e pode sinalizar vários eventos deletérios. O NO produzido em grande quantidade pela nNOS, reage com um ânion superóxido formando peroxinitrito, uma espécie altamente reativa que promove dano tecidual. Espécies reativas de oxigênio podem iniciar processo inflamatório, com recrutamento de células. As células recrutadas pelo processo inflamatório liberam NO sintetizado pela iNOS, que acarreta danos a estrutura celular por mecanismos semelhante à nNOS. Ao contrário dessas duas, o NO sintetizado pela eNOS (constitutiva do endotélio) pode conferir proteção ao tecido por aumentar a microcirculação (CABRAL et al., 1997).

1.7. SISTEMA RENINA – ANGIOTENSINA

A renina foi o primeiro componente do SRA a ser descoberto, em 1898 por Tigersted, que analisou o efeito de extratos renais de coelho, sob a pressão arterial (TIGERSTEDT; BERGMAN, 1898). Dois grupos independentes conduzidos pelo Dr. Eduardo Braun-Menéndez, na Argentina, e Dr. Irving Page, nos Estados Unidos, identificaram o produto biologicamente ativo da renina, o qual chamaram “hipertensina” e “angiotonina”. Mais tarde, os dois grupos acordaram em nomear o produto descoberto em “angiotensina” (PAGE, 1940; XU et al., 2011).

A ECA foi descoberta no plasma por Skeggs et al. em 1956, através da observação de que a conversão do peptídeo inativo ANG I em um peptídeo ativo vasoconstrictor – ANG II, acontecia no plasma. Contudo, em 1967, Ng e Vane mostraram que a ECA da circulação sistêmica convertia ANG I em ANG II muito lentamente, e que a conversão rápida ocorre na circulação pulmonar (NG; VANE, 1968).

O SRA (Sistema Renina-Angiotensina) é um sistema hormonal composto por várias enzimas e peptídeos ativos e inativos, que juntos desempenham um importante papel na regulação fisiológica do sistema cardiovascular e na homeostasia dos fluidos corporais. Classicamente, o angiotensinogênio (AGT) sintetizado no fígado é hidrolisado pela renina, uma enzima produzida nas células justaglomerulares dos rins. A hidrólise do angiotensinogênio pela renina produz um decapeptídeo inativo – a angiotensina I (ANG I), a qual é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA), de origem endotelial, em um octapeptídeo biologicamente ativo – a angiotensina II (ANG II) (SOUBRIER et al., 1993).

Nas últimas décadas ocorreram mudanças substanciais na compreensão do SRA. Atualmente, sabe-se que o SRA circulante e aquele presente nos tecidos, é muito mais complexo do que o descrito anteriormente (SANTOS et al., 2013; MARIAN, 2013). O conceito mais amplo e moderno do SRA inclui os componentes clássicos (renina, enzima conversora [ECA] de angiotensina [ANG], ANG II, ANG III, e Receptores de ANG do tipo 1 e 2 [AT1R e AT2R]) e novas enzimas, peptídeos e receptores (ECA 2, 3, 4; ANG-(1-7), receptor de pro-renina 5 e receptor MAS). Mais recentemente, novos componentes foram identificados (ANG A, Alamandina, e Mas-related G-protein-coupled receptor D – MRGD), sugerindo novas possibilidades de interação entre os componentes do SRA (Figura 4) (SANTOS, 2014).

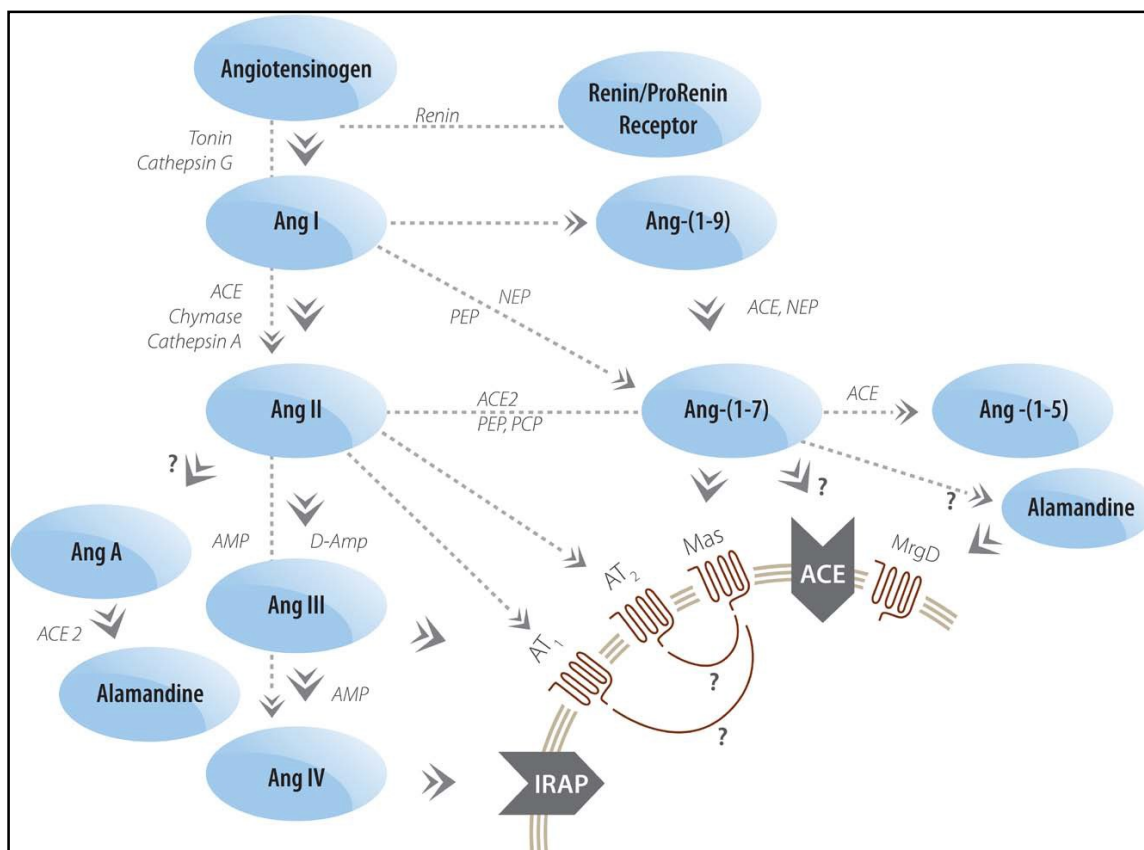


FIGURA 4 Modelo simplificado do SRA.

ACE – nomeclatura em inglês para enzima conversora de angiotensina; AMP - aminopeptidase; ANG – angiotensina; AT1 – receptor de angiotensina do tipo 1; AT2 – receptor de angiotensina do tipo 2; D-Amp – dipeptidil aminopeptidase I-III; IRAP – aminopeptidase regulada pela insulina; MAS – receptor Mas; MrgD – Mas related G-protein coupled receptor D; NEP – neutral endopeptidase; PCP – prolyl carboxypeptidase e PEP - Prolyl endopeptidase. (SANTOS, 2014).

O SRA consiste em dois eixos distintos e contra-regulatórios. O eixo clássico ECA/ Ang II/ AT1R age promovendo efeitos de vasoconstrição, proliferação celular, hipertensão, agregação plaquetária e trombose. A hiperatividade deste eixo está relacionado à hipertensão arterial (HA) e doenças cardiovasculares, tais como: hipertrofia, disfunção cardíaca, AVC, doenças das artérias coronarianas e estágios finais das doenças renais. O eixo clássico do SRA é o alvo primário para a terapia com antihipertesivos. O eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ MasR, constitui um eixo alternativo que possui um mecanismo intrínseco para induzir ações protetoras, através da contra-regulação do eixo ECA/ Ang II/ AT1R. Desta forma o primeiro induz várias ações benéficas em doenças do sistema cardiovascular. Sendo assim, o eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ MasR, representa novas

possibilidades para estratégias terapêuticas (FERREIRA et al., 2010; XU et al., 2011).

1.7.1. ANGIOTENSINA-(1-7)

Ang-(1-7) é um componente chave do SRA, o que representa uma das mais significantes mudanças conceituais neste importante sistema hormonal (SANTOS, 2014). A presença fisiológica de Ang-(1-7) foi primeiramente detectada no sangue humano (SEMPLE et al., 1976); depois em cães (SANTOS et al., 1988) e no cérebro de ratos (SCHIAVONE et al., 1988). Estudos posteriores mostraram que Ang-(1-7) é um constituinte endógeno do cérebro, em áreas que incluem hipotálamo, medula oblonga e amígdala. Além disso, a Ang-(1-7) pode ser encontrada nas glândulas adrenais e no plasma de ratos normais (CHAPPELL et al., 1989). Contudo a cascata enzimática que leva a produção deste peptídeo só foi compreendida posteriormente. Atualmente são conhecidas três diferentes vias que levam a produção de Ang-(1-7). A primeira via produz Ang-(1-7), diretamente da ANG I, através da interação com prolyl-endopeptidase ou neutral endopeptidase (neprilysin), as quais clivam a ligação dos resíduos Pro7-Phe8. Na segunda via, ANG II é convertida diretamente em Ang-(1-7) pela ação das enzimas ECA2, prolyl-carboxy-peptidase ou prolyl-endopeptidases. Por fim, a terceira via (indireta), converte ANG I em ANG-(1-9) pela ação da ECA2, e então ANG-(1-9) é convertida em Ang-(1-7) pela ação da ECA ou neprilysin. Muitas outras enzimas podem participar destas três vias. Contudo, recentemente foi relatado que no coração de ratos hipertensos, a maioria da Ang-(1-7) é resultado da degradação de ANG II pela ação de ECA2 (XU et al., 2011).

A síntese de Ang-(1-7) ocorre principalmente, no espaço extracelular, isto ocorre porque a ECA2 é uma proteína transmembrana com um sítio catalítico localizado fora da célula. Porém a forma secretada de ECA2 pode ser processada por endocitose, levando a formação do heptapeptídeo dentro da célula (GUY et al., 2005).

1.7.2. EFEITOS DA ANGIOTESINA-(1-7)

Recentemente várias evidências tem sugerido que Ang-(1-7) promove efeitos benéficos através da contra regulação dos efeitos produzidos pelo eixo ECA/ ANG II/ AT1R(TAN et al., 2007; FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2013; FREUND et al., 2014).

Tanto o pâncreas, quanto o tecido adiposo possuem componentes do SRA, e estes componentes locais são altamente regulados pela ingestão de alimentos. Recentemente, foi demonstrado que uma dieta rica em açúcar pode elevar os níveis de AGT, ACE e AT1R no pâncreas, porém no tecido adiposo os níveis de ACE2 e Ang-(1-7) é que estão aumentados. Em outras palavras, isso indica que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas constitui um importante alvo no tratamento de disfunções metabólicas (GUPTE et al., 2008). (Figura 5)

Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a Ang-(1-7) possui papel anti-proliferativo e propriedades anti-angiogênicas, o que lhe confere uma importante alternativa nos estudos para tratamento do câncer. Foi demonstrado que o tratamento com Ang-(1-7) inibe o crescimento celular de linhagens ,SK-LU-1, A549 e SKMES-1 (GALLAGHER; TALLANT, 2004). (Figura 5)

Muitos tecidos do sistema reprodutivo expressam um SRA local, que influencia diretamente funções vasculares. Desta forma provou-se que o SRA local desempenha um importante papel na espermatogênese; na maturação do folículo e ovulação; na função do endométrio e gravidez (PEREIRA et al., 2009). (Figura 5)

Evidências também sugerem um papel protetor da Ang-(1-7) contra fibrose. Tal condição patológica é caracterizada pela deposição excessiva de colágeno extracelular pelos fibroblastos. A proliferação de fibrócitos circulantes, precursores de fibroblastos maduros, parece estar envolvido na progressão de tecidos fibróticos e inclusive na fibrose do miocárdio. A Ang-(1-) causa apoptose destas células, inibe a proliferação e diminui a secreção de colágeno, levando a

regressão da fibrose cardíaca (WANG et al., 2012; PASSOS-SILVA et al., 2013). (Figura 5)

O eixo clássico do SRA (ECA/ANGII/AT1R) contribui para o processo inflamatório, aumento a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão. Por outro lado, estudos demonstraram que animais tratados com Ang-(1-7) tiveram redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL (Interleucina)-6, após estimulação com LPS (lipopolissacarídeo) (SOUZA; COSTA-NETO, 2011; PASSOS-SILVA et al., 2013). (Figura 5)

Ang-(1-7) é um dos principais peptídeos do SRA presentes do CNS e é expressa em diferentes regiões dos cérebro, incluindo hipotálamo; hipocampo; amígdala e muitas outras. Além dos seus efeitos na neuromodulação do barorreflexo, a Ang-(1-7) também influencia outras funções no cérebro como aprendizagem, memória e neuroproteção contra isquemia. Estudos mostram que a deleção ou baixa expressão do receptor Mas leva a piora no reconhecimento de objetos, indicando que Ang-(1-7)/Mas é um importante modulador no processo de aprendizagem e memória (LAZARONI et al., 2012; PASSOS-SILVA et al., 2013). (Figura 5)

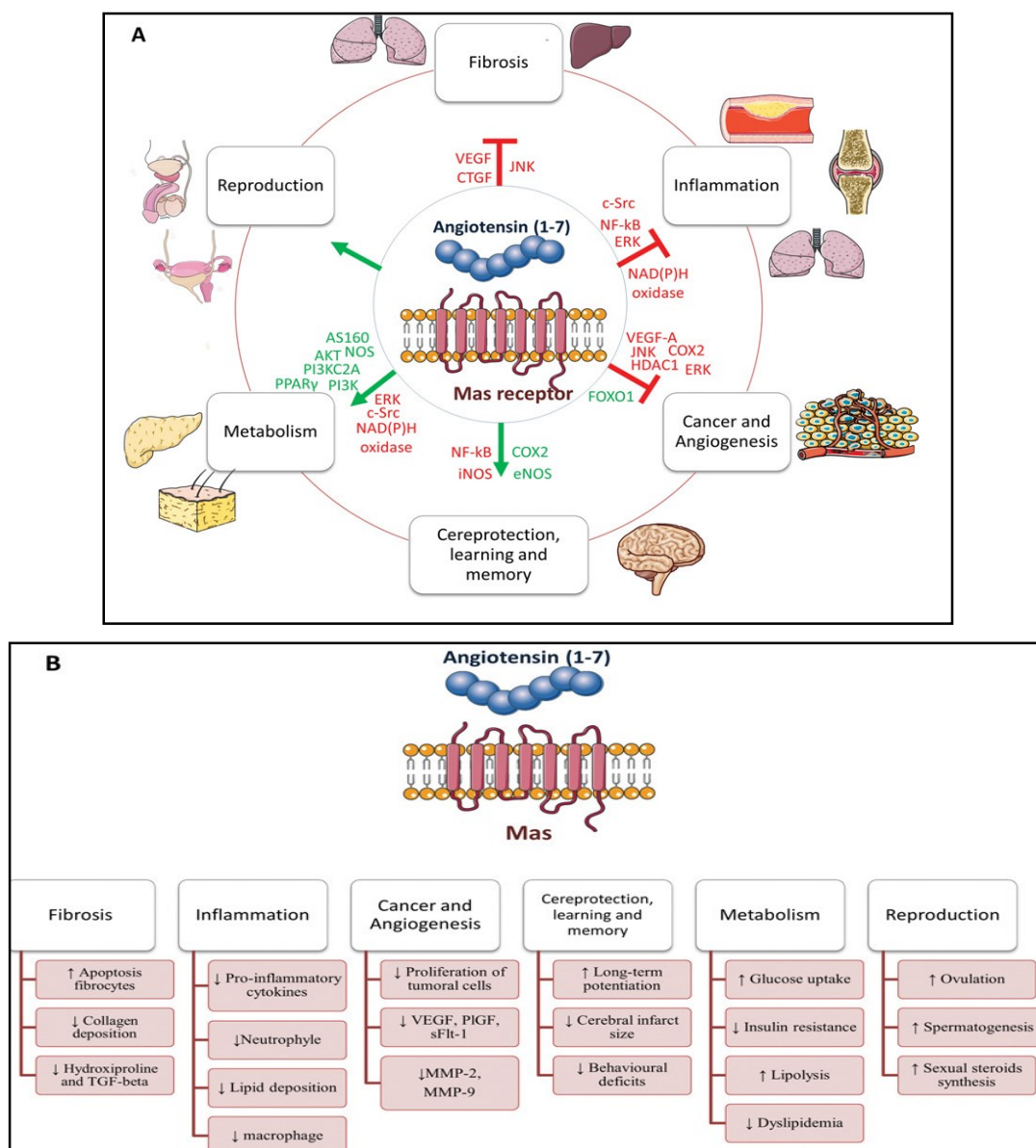


FIGURA 5 Principais ações não-cardiovasculares da Ang-(1-7) via receptor Mas em diferentes tecidos e processos.

(a) Moléculas sinalizadoras envolvidas na ação da Ang-(1-7). As moléculas em verde e vermelho indicam ativação e inibição pela Ang-(1-7)/Mas, respectivamente. As setas verdes indicam ativação ou efeitos positivos, e as linhas em vermelho indicam inibição do processo. (B) Resumo das principais ações não-cardiovasculares da Ang-(1-7) em cada processo. (PASSOS-SILVA et al., 2013; SANTOS, 2014).

1.7.3. VIAS DE SINALIZAÇÃO DA ANG-(1-7)

A descoberta da Ang-(1-7) com ligante endógeno do receptor Mas, e a ECA2 como uma isoforma da ECA, que converte, predominantemente, AngII em Ang-(1-7), fez com que especial atenção fosse dispensada a este peptídeo, outrora considerado inativo (SANTOS et al., 2003). Enquanto AngII se liga, preferencialmente, ao receptor AT1 promovendo vasoconstrição; proliferação celular e hipertrofia, Ang-(1-7)/ECA2/Mas funcionam como um eixo contra regulatório (MACHADO et al., 2001).

Já é conhecido que a Ang-(1-7), através do seu receptor Mas leva a vasodilatação devido a produção de NO, por uma cascata sinalizadora via fosfatidilinositol 3-quinase (PIK3)/ proteína quinase B (AKT) (SAMPAIO et al., 2006). Além disso a Ang-(1-7) regula negativamente proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK1) e NAD(P)H oxidase, sinalizando antagonicamente às ações promovidas pela AngII (SAMPAIO et al., 2007).

Estudos recentes tem demonstrado a estreita relação entre as vias de sinalização do SRA e insulina, de tal que forma que Ang II modula negativamente a sinalização de insulina e a Ang-(1-7), de forma antagonica, promove o aumento das ações da insulina (GIANI et al., 2007; MARIO et al., 2008).

Analisando a literatura é possível concluir o impacto significativo da sinalização da Ang-(1-7) através do seu receptor Mas, nos processos fisiológicos. Contudo os mecanismos moleculares que desencadeiam as ações promovida pela Ang-(1-7) ainda não foram completamente elucidados.

Recentemente, VERANO-BRAGA et al., (2012) propôs um modelo de sinalização para Ang-(1-7), utilizando método quantitativo de fosfoproteômica (Figura 6). Neste trabalho as vias de sinalização foram avaliadas em culturas de

Células Endoteliais de Aorta Humana (HAEC), onde estas foram estimuladas com Ang-(1-7) em tempos diferentes.

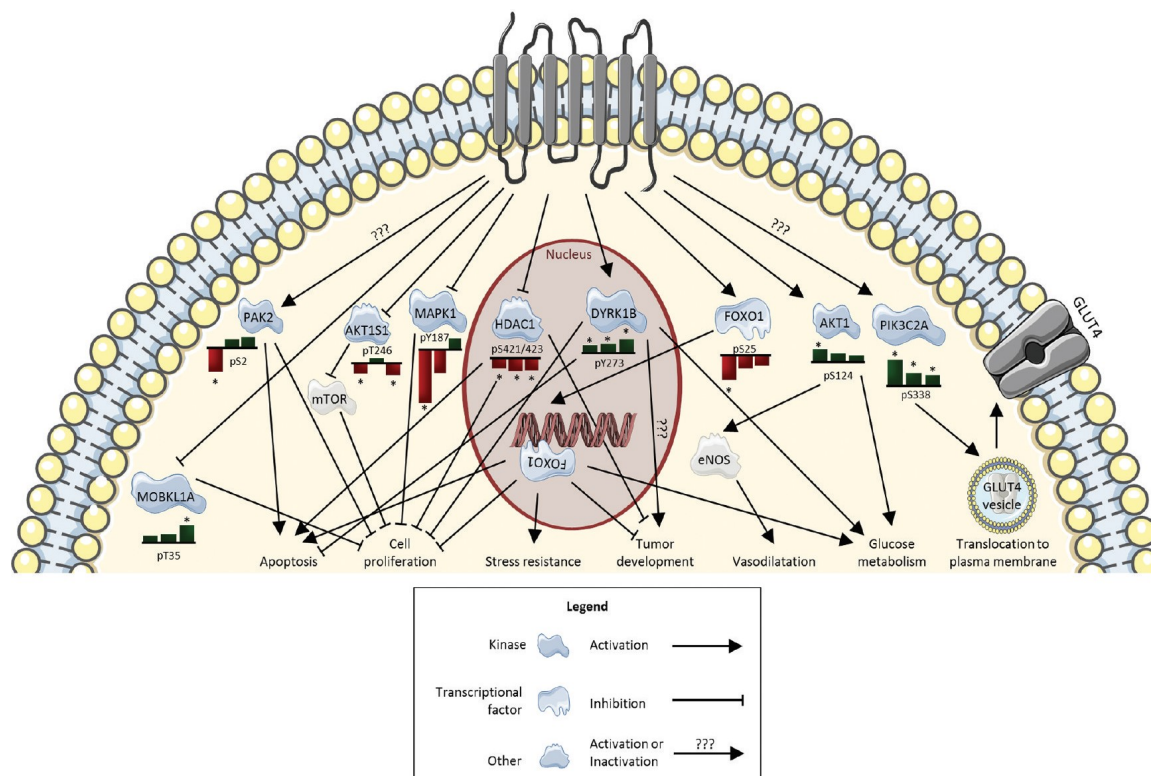


FIGURA 6 Modelo de sinalização da Ang-(1-7)/Mas.

A figura representa eventos de fosforilação à partir da estimulação do receptor Mas pelo seu ligante Ang-(1-7), bem como suas consequências (VERANO-BRAGA et al., 2012)

1.7.4. O EIXO ECA2/ ANG-(1-7)/ MAS NO CÉREBRO

Todos os componentes do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas são expressos no tecido cerebral. Além disso, o cérebro é o órgão que possui maior expressão do receptor Mas, em particular no hipocampo e córtex piriforme (XIA; LAZARTIGUES, 2008; BADER, 2013). Estudos de imunohistoquímica mostraram a presença de Ang-(1-7) nos corpos celulares de neurônios, e que os vasos sanguíneos do cérebro são importantes sítios para formação e ação da Ang-(1-7) (XU et al., 2011).

Evidências sugerem que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas é necessário em processos de aprendizagem e memória, uma vez que animais que apresentam deleção do receptor Mas (MasKo) falham em tarefas de reconhecimento de objetos (LAZARONI et al., 2012). Além disso a Ang-(1-7) através do seu receptor Mas aumenta a LTP no hipocampo (HELLNER et al., 2005; LAZARONI et al., 2012).

Em relação as ações cardiovasculares orquestradas pelo CNS, estudos demonstram que a Ang-(1-7) aumenta a sensibilidade do barorreflexo e influencia diretamente a pressão arterial (MATOS et al., 2010).

Nas células endoteliais, Ang-(1-7) estimula a liberação de prostaglandina, aumenta a liberação de óxido nítrico (NO), aumenta ações metabólicas de bradicinina via inibição da atividade de ECA, e inibe o crescimento celular do músculo liso vascular (JAISWAL et al., 1992; XU et al., 2011).

A administração, *in vivo*, de médias (100pmol) e altas (10nmol) doses de (Ang-(1-7) promove liberação de óxido nítrico (NO) e aumenta a expressão da isoforma eNOS. O NO produzido pela eNOS diminui apoptose e confere proteção ao tecido cerebral, contra AVC em modelos de oclusão da artéria cerebral média. Contudo concentrações patológicas de NO produzido pelas isoformas iNOS e nNOS induzem apoptose e são neurotóxicas (MIN et al., 2002; ZHANG et al., 2008). Além disso evidências recentes demonstraram que Ang-(1-7) é capaz de reduzir o estresse oxidativo e atenuar apoptose no cérebro (JIANG, TENG et al., 2013).

Recentemente, foi demonstrado que, após um insulto isquêmico a concentração sérica de Ang-(1-7), bem como a expressão de ECA2 e Mas, estão aumentados, sugerindo portanto que este eixo é fortemente regulado durante a isquemia cerebral (LU et al., 2013).

1.8. FATIAS HIPOCAMPAIS SUBMETIDAS À POG (ISQUEMIA *IN VITRO*)

A utilização do tecido cerebral *in vitro* sem prévio cultivo, é uma ferramenta viável para estudos envolvendo isquemia cerebral. Neste modelo, utiliza-se por exemplo fatias de hipocampo (400 µm), que após serem obtidas, são rapidamente expostas à privação de oxigênio e glicose, simulando portanto o que ocorre *in vivo*. Este método foi proposto primeiramente por Moro e colaboradores em 1998, e desde então vem sendo adaptado e extensamente utilizado para estudos de neuroproteção (MORO et al., 1998; CÁRDENAS et al., 2000)

Para investigar a lesão causada pela POG (privação de oxigênio e glicose), diferentes parâmetros de citotoxicidade são comumente empregados como marcadores de lesão celular cerebral (CIMAROSTI et al., 2001; NORABERG, 2004). A degeneração celular pode ser facilmente quantificada pela contagem de células mortas coradas e/ou mensurando a liberação de lactado desidrogenase no meio de incubação. Alguns métodos de marcação são bastante empregados neste tipo de estudo, com por exemplo o marcador de células mortas etídio homodímero (EthD-1) e o método colorimétrico utilizando o sal de tetrazolium – MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide], que permite mensurar atividade mitocondrial de células vivas (MONETTE et al., 1998; TAVARES, 2003).

A utilização deste método permite excluir parâmetros sistêmicos mais complexos, como aqueles apresentados em modelos *in vivo*, desta forma, a compreensão dos mecanismos moleculares evocados neste método, torna-se mais clara (CIMAROSTI et al., 2001).

2. JUSTIFICATIVA

O AVC é uma causa permanente de morte e de incapacidade no Brasil e no mundo. O tratamento efetivo ainda é limitado e basicamente composto por métodos paliativos. Os indivíduos que sobrevivem a um AVC necessitam de cuidados contínuos e tratamento reabilitador, visto que a progressão da doença ocorre de maneira crônica. Neste sentido, pesquisas nesta área são de suma

importância para que se alcance novas estratégias terapêuticas que visem prevenir e reabilitar indivíduos acometidos por AVC ou àqueles sob o risco. Desta forma, a manipulação de novos componentes do SRA, tem demonstrado efeitos benéficos, em modelos animais contra a isquemia cerebral, sugerindo um novo alvo terapêutico para doenças crônicas como AVC.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos envolvidos na neuroproteção promovida pela Ang-(1-7) em fatias hipocâmpais, submetidas à um protocolo de isquemia *in vitro* (privação de oxigênio e glicose-POG).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a viabilidade celular em fatias hipocâmpais após protocolo de privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), em fatias de grupos teste e controle com Ang-(1-7) e A-779.
- ✓ Quantificar a expressão de caspase 3, 8 e 9 em fatias hipocâmpais após protocolo de privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), em fatias de grupos teste e controle com Ang-(1-7) e A-779.
- ✓ Quantificar a liberação de glutamato acumulado em meio de incubação em fatias hipocâmpais após protocolo de privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), em grupos teste e controle com Ang-(1-7) e A-779.
- ✓ Quantificar a concentração de nitrito (NO₂) acumulado no meio de incubação em fatias hipocâmpais após protocolo de privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*), em grupos teste e controle com Ang-(1-7) e A-779.

4. MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, com 7-8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG). Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água “*ad libitum*” e tiveram temperatura ambiente controlada (25°), com foto período de 12h claro/escuro. Todos os experimentos foram conduzidos de forma a evitar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Este trabalho está de acordo com as normas estabelecidas pelo CEUA, com protocolo nº 178/2014.

4.2. DISSECAÇÃO E PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os cérebros rapidamente removidos e mergulhados numa solução de ACSF (Artificial Cerebrospinal Fluid) com glicose, previamente oxigenada (mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5 % CO₂). Posteriormente foram colocados sobre uma placa de Petri com papel de filtro, invertida sobre o gelo, umedecida com solução de ACSF gelado (4°C) e aerado, para a dissecação dos hipocampos. Em seguida, os hipocampos foram fatiados imediatamente numa espessura de 400 µm usando-se fatiador de tecidos do tipo “chopper” (Tissue Chopper / McIlwain™ Brinkmann Instruments, England) (as três primeiras fatias do hipocampo de cada extremidade do tecido foram descartadas), e levadas para o banho de agitação, mantido a 37°C. As fatias foram randomizadas e divididas em 3 grupos: 1) Grupo de fatias que receberam apenas a solução controle (ACSF). 2) Grupo de fatias que receberam Ang-(1-7) 10µM diluída em ACSF. 3) Grupo de fatias que receberam Ang-(1-7) 10µM + A-779 10µM diluídos em ACSF. Com o intuito de avaliar o efeito isolado de A-779, um 4º grupo recebeu A-779 10µM, diluído em ACSF.

Cada grupo foi dividido em dois subgrupos: 1) grupo de fatias que foram submetidas à isquemia *in vitro*. 2) grupo de fatias que não foram submetidas à isquemia *in vitro*.

4.3. PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (INSULTO ISQUÊMICO *IN VITRO*)

O subgrupo *isquemia* foi submetido a privação de glicose e oxigênio, através da incubação com meio contendo ACSF, sem glicose e aerado com uma mistura gasosa contendo 95% de N₂ e 5% CO₂, durante 60 minutos. Após este período de isquemia, as fatias de hipocampo foram submetidas à reperfusão em solução ACSF com glicose (10mM) e oxigênio para recuperação por mais 4 horas. O subgrupo controle foi mantido em solução ACSF aerado com uma mistura carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂ com glicose (10mM) durante o período de isquemia e reperfusão.

4.4. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

4.4.1. LACTATO DESIDROGENASE

Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica, que em casos de lise celular, é extravasada para o meio extracelular. A atividade da LDH, liberada no meio de incubação, foi determinada usando um kit comercial para LDH (Bioclin, Brasil), a fim de verificar o dano celular (lise). A LDH catalisa a redução do Piruvato com o NADH, obtendo-se Lactato e NAD⁺. A concentração catalítica se determina a partir da velocidade de decomposição do NADH, medida pela queda da absorvidade a 340 nm.

4.4.2. ETÍDIO-HOMODÍMERO

Para a quantificação da morte celular foi utilizado o marcador Ethidium Homodimer (EthD-1, 2mM) (Live/Dead – Viability/Cytotoxicity Kit – Molecular Probes Inc., USA), que permite a constatação de alterações físicas e químicas em

células com membranas danificadas. Ao final do período de reperfusão, cada fatia, de ambos subgrupos experimentais, foi incubada em um poço de uma placa de cultura (96 wells), em solução contendo 3 μ l de EthD-1 (2mM), dissolvido em 1 ml de solução de ACSF com glicose (10mM), oxigenada previamente. O conjunto foi protegido da luz por um período de 30 min. à temperatura ambiente. Após incubação a solução de marcação foi retirada e as fatias foram lavadas com 1 ml de solução de ACSF com glicose (10mM), oxigenada previamente, por 30 min. Após lavagem, as fatias foram fixadas em 1 ml de paraformaldeído 4% por 15 min., lavadas com 1 ml de solução tampão fosfato (PBS), por 5 minutos, seguidas de mais 2 lavagens rápidas com 1ml de ACSF com glicose (10mM), oxigenada previamente por 5 min. Assim, após fixação e lavagem, as fatias foram montadas em lâminas com Vectashield®, sobrepostas com lamínulas e encaminhadas ao microscópio de fluorescência (Axio Imager.M2 - Zeiss). As imagens no microscópio de fluorescência foram adquiridas através do software Axiovision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha), utilizando objetiva com aumento de 20x. As regiões CA1 dos hipocampos, a partir do giro denteado, foram selecionadas e o tempo de exposição à luz calculada automaticamente. A captação da fluorescência, resultante da marcação com EthD-1 (excitação/emissão:528/617nm), foi realizada através de um filtro óptico correspondente a seu comprimento de onda. Posteriormente, foram submetidas a um processamento, através de um filtro de ajuste dos pixels pela mediana, de forma que uma pequena proporção de pixels irrelevantes fosse descartada e a escala de cinza determinada fosse exibida de uma forma adaptada a um histograma. As imagens adquiridas foram salvas em alta resolução (1024x768) e gravadas como arquivos no formato *.tiff para posterior quantificação. A análise quantitativa das imagens foi realizada no software livre Image J (NIH, USA). As imagens foram inicialmente convertidas para 8-bits e processadas igualmente para diminuição do background. Posteriormente, através dos respectivos histogramas, foi determinado um valor para o limiar basal de fluorescência. Estabelecido este limiar, fixo para todas as imagens, a porcentagem de células mortas foi quantificada, de acordo a quantidade de pixels marcados por região selecionada. Quanto maior o número de

pixels marcadas, maior o número de células mortas (MONETTE et al., 1998; LEITE et al., 2012; MOURÃO et al., 2014).

4.5. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE CELULAR

4.5.1. ATIVIDADE DE CASPASE-3

A caspase 3 é uma enzima efetora que cliva proteínas em seu trajeto levando a apoptose celular. Logo sua mensuração consiste em importante ferramenta para investigar parâmetro de morte celular. A análise da expressão de caspase 3 foi realizada através do EnzChek® Caspase Assay Kit (MOLECULAR PROBES, USA). Após o período de reperfusão, as fatias foram homogeneizadas em solução tampão de lise somado a um coquetel inibidor de protease, seguido de centrifugação a 5.000rpm por 5 min; o sobrenadante foi recolhido e armazenado para análise. Após a centrifugação foram adicionadas 50µL do sobrenadante a 20µL do substrato 7-amino-4-metilcumarim (10mM) e 980µL de solução tampão. O conjunto foi mantido a 37°C durante 30 minutos. Após completar o volume da amostra com solução tampão até atingir 2000µL, a leitura foi feita por um espectrofluorímetro (excitação e emissão ~342/441) (NASCIMENTO et al., 2007; MOURÃO et al., 2014)

4.5.2. ATIVIDADE DE CASPASE-8

A quantificação da expressão de caspas 8 será realizada através do Kit *Caspase-8 Fluorimetric Protease Assay* (MOLECULAR PROBES, USA). Este método consiste na utilização do substrato IETD-AFC. O substrato é clivado na presença da protease, liberando radical AFC, que pode ser quantificado por espectrofluorímetro nos comprimentos, 400nm de excitação e 505 de emissão. Conforme instruções do fabricante, alíquotas contendo 100 µg de proteínas, determinado pelo método de Bradford, (1976), foram adicionadas a 50µL de solução tampão 2x. Ao final foi acrescentado 5µL de substrato IETD-AFC (1mM) e a reação foi mantida protegida da luz, a 37°C. Após duas horas, e a leitura foi realizada em espectrofluorímetro (MOURÃO et al., 2014).

4.5.3. ATIVIDADE DE CASPASE-9

A quantificação de caspase 9 foi realizada através do Kit Caspase-9 *Colorimetric Pretease Assay* – (MOLECULAR PROBES, USA), cujo ensaio consiste da utilização do substrato LEHD-p-NA. Na presença da protease o substrato é então clivado liberando o radical p-NA. A absorção de luz do radical por ser quantificada utilizando um espectrofotômetro nos comprimentos de onda 400 – 405nm. Para este ensaio, alíquotas contendo 100µg de proteína, determinado pelo método de Bradford (1976), foram adicionadas a 50µL de solução tampão 2x. Ao final foi acrescentado 5µL do substrato LEHD-pNA (4mM). A reação foi protegida da luz, a 37°C e após 2 horas foi realizada a leitura em um leitor ELISA.

4.6. ENSAIO PARA QUANTIFICAR A LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO

A mensuração do glutamato acumulado no sobrenadante das fatias foi determinada através de uma reação enzimática, com aumento da fluorescência devido à produção de NADPH, na presença de glutamato desidrogenase (GDH) e NADP⁺ (NICHOLLS et al., 1987) O ensaio consiste na adição de NADP⁺ (40 mM), GDH (50 U.I) em solução KRH (185 µl), e amostra (10 µl) a 37°C. Este ao ser excitado por luz com um comprimento de onda de 340 nm emite uma fluorescência que pode ser detectada e quantificada em comprimento de onda de 440nm em um espectrofluorímetro de placa (Synergy ®) (MASSENSINI et al., 1998; LEITE et al., 2012; MOURÃO et al., 2014). O experimento foi realizado em triplicata e o background de fluorescência foi determinado e subtraído dos valores encontrados, através da leitura do NADP⁺ e do GDH junto ao tampão. Para a quantificação final utilizou-se um padrão interno de glutamato (1 nmol/µl) como referência, para o estabelecimento de uma curva padrão. A normalização foi realizada através da dosagem de proteínas totais das amostras das fatias de hipocampo homogeneizadas previamente, como citado anteriormente (BRADFORD, 1976). Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína

4.7. ENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO

A NOS (Óxido Nítrico Sintase) participa de vários processos fisiológicos regulatórios e a mensuração da sua atividade consiste em importante ferramenta para entendimento do mecanismo de ação destes processos. As medidas de nitrito foram realizadas através do método fluorescente utilizando o 2,3-diaminonaphtaleno (DAN; Sigma) (MISKO et al., 1993; LEITE et al., 2012). Em resumo, 15 µL de DAN (0.05 mg/ml) foram adicionados a 150 µl de meio de incubação das fatias de hipocampo. Após 10 min. de incubação a 20°C protegido da luz, a reação foi interrompida com 15 µl de NaOH 2.8 M. A formação do produto fluorescente foi medida utilizando um leitor de placa fluorescente (Cary Eclipse Microplate reader; Varian ®) excitação a 360 nm e emissão a 440 nm. A normalização foi realizada através da dosagem de proteínas totais das amostras das fatias de córtex e hipocampo homogeneizadas previamente, como citado anteriormente (BRADFORD, 1976)

4.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

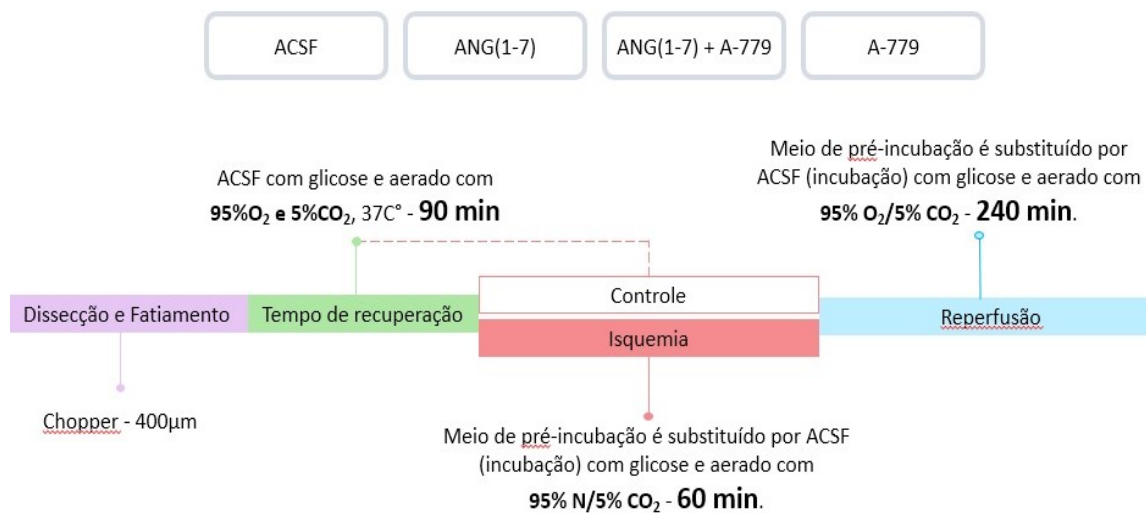


FIGURA 7 Delineamento experimental. O cérebro dos animais foram rapidamente dissecados e imersos em ACSF gelado (4°C) com glicose previamente aerado com 95% O₂ e 5% CO₂. Em seguida os hipocampus foram dissecados e fatiados em 400µm. As fatias foram submetidas à recuperação com ACSF com glicose previamente aerado com 95% O₂ e 5% CO₂ por 90 min. Em seguida as fatias foram divididas, aleatoriamente em grupos, em placas de cultura. Os grupos então receberam Ang-(1-7) (10µM) ou Ang-(1-7) (10µM) + A-779 (10µM) ou somente foram mantidas em ACSF (sem nenhum tratamento). As fatias foram então submetidas à POG (isquemia), sendo que os grupos controles forma mantidos em condições normais. Os ensaios de caspase e viabilidade celular foram realizados após a reperfusão. Os ensaios para glutamato e Nitrito foram realizados logo após a isquemia.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises utilizou-se Two-way ANOVA, *post hoc* Student Newman-Keuls (SNK) ou Bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e valores com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.RESULTADOS

5.1. Ang-(1-7) reduz a morte celular em fatias de hipocampo submetidas à isquemia *in vitro*.

A quantificação da atividade de LDH, um marcador de morte celular, no meio de incubação, revelou níveis significativamente menores ($p < 0,05$) no grupo Ang-(1-7) isquemia ($5,8 \pm 0,9$), comparados com o grupo não tratado ACSF isquemia ($18,7 \pm 4,3$), sob as mesmas condições. Já no grupo Ang-(1-7)+A-779 isquemia, o níveis de LDH foram, estatisticamente, maiores ($19,1 \pm 4,2$) que os níveis encontrados para o grupo Ang-(1-7) isquemia ($5,8 \pm 0,9$). O protocolo de isquemia teve efeito significativo na análise da viabilidade com LDH ($F[1,3]=29,8$, $p < 0,01$). O tratamento com Ang-(1-7) não teve efeito significativo sobre a análise da viabilidade com LDH ($F[3,3]=2,5$, $p > 0,05$). Uma interação significativa entre o protocolo de isquemia e o tratamento com Ang-(1-7) foi verificada ($F[3,33]=3,905$, $p < 0,01$) (figura 8).

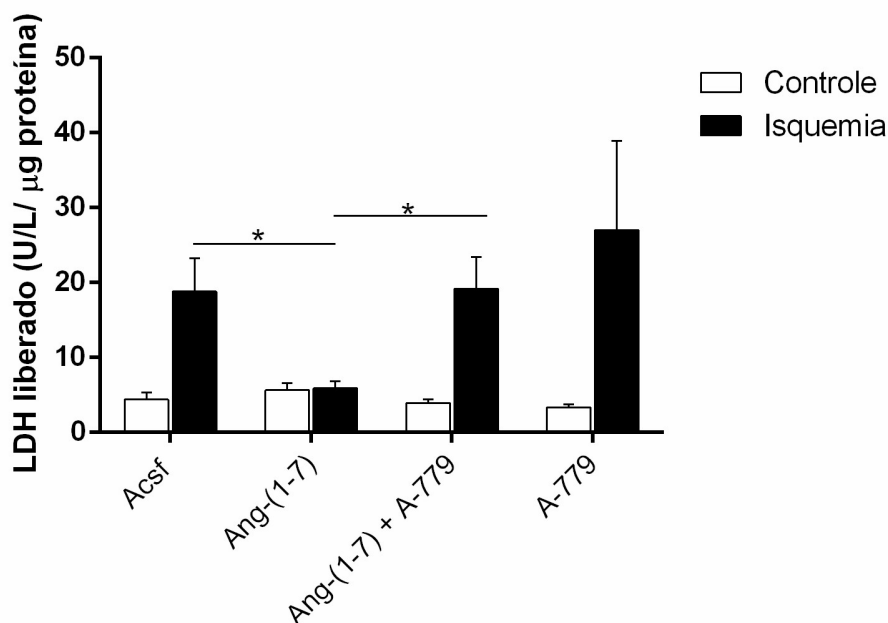


FIGURA 8 Efeito da Ang-(1-7) sob a viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas à Isquemia *in vitro*.

Avaliação da atividade enzimática (LDH) acumulada no meio de incubação em fatias de hipocampo de camundongos, após protocolo de isquemia *in vitro* (POG: 60 min) e reperusão (240 min.). Os grupos controles foram mantidos em ACSF com Glicose 10mM, 95% O₂ e 5% CO₂. n= 3-6. Colunas representam média±E.P.M (erro padrão da média). Two-way ANOVA, post-hoc *Bonferroni*. Comparação intragrupo, * p<0,05.

A análise da viabilidade celular realizada pelo ensaio de fluorescência (EthD-1), revelou que o protocolo de isquemia *in vitro* elevou os níveis de morte (dado em porcentagem) de todos os grupos em relação ao correspondente grupo controle, sendo significativamente, efetivo (F[1,18]=26,6, p<0,01). Um efeito significativo do tratamento com Ang-(1-7) também foi observado (F[2,18]=6,4, p<0,01). Houve interação significativa entre o protocolo de isquemia *in vitro* e Ang-(1-7) (F[2,1]=3,6, p<0,05. Contudo este aumento na porcentagem de morte, não foi significativo para o grupo Ang-(1-7) isquemia, quando comparado ao controle (13,9±2,258% vs. 9,6±1,1%). Além disso, a morte celular no grupo Ang-(1-7) isquemia (13,9±2,2 %) foi estatisticamente menor, quando comparado ao grupo não tratado ACSF Isquemia (33,3±5,5%). O bloqueio do receptor MAS reverteu o efeito da Ang-(1-7) outrora observado. Sendo assim, no grupo Ang-(1-7)+A-779 isquemia (36,6±7,1%), a porcentagem de morte foi estatisticamente maior do

aquela encontrada no grupo Ang-(1-7) isquemia, alcançado os níveis do grupo não tratado - ACSF isquemia ($33,3\pm 5,5$) (figura 9).

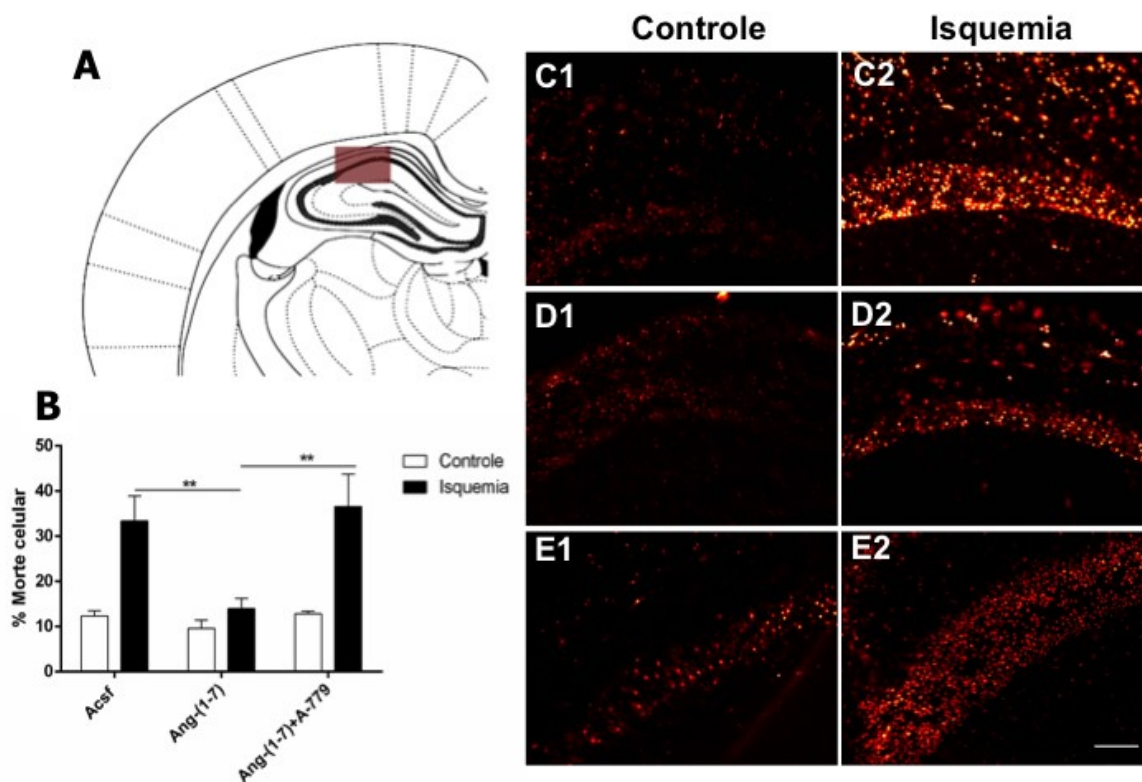


FIGURA 9 Viabilidade celular em fatias de hipocampo após isquemia *in vitro*.

Análise da viabilidade celular através de método fluorescente, empregando o marcador de morte celular - EthD-1. As fatias foram analisadas após 60min. de isquemia e 240min. de reperfusão. **A)** Imagem ilustrativa da região CA1 do hipocampo. **B)** Quantificação das imagens **C1)** ACSF controle. **C2)** ACSF isquemia. **D1)** Ang-(1-7) controle **D2)** Ang-(1-7) isquemia. **E1)** Ang-(1-7)+A-779 controle. **E2)** Ang-(1-7)+A-779 isquemia. n=4 Os resultados foram expressos como média±EPM da porcentagem de morte celular, que corresponde a intensidade de pixels. Two-way ANOVA, *post-hoc Bonferroni*. Comparação intragrupos: **p<0,01.

5.2. CASPASES

5.2.1. Atividade de caspase-8

Um efeito significativo do protocolo de isquemia *in vitro* foi observado sobre a expressão de caspase-8 ativa nas fatias de hipocampo ($F[1,2] = 63,6$, $p<0,01$).

Contudo o tratamento com Ang-(1-7) não teve efeito significativo na expressão de caspase-8 ativa ($F[3,2] = 0,1, p > 0,05$). Além disso não foi possível verificar interação entre os dois parâmetros ($F[3,2] = 0,1, p > 0,05$) (figura 10).

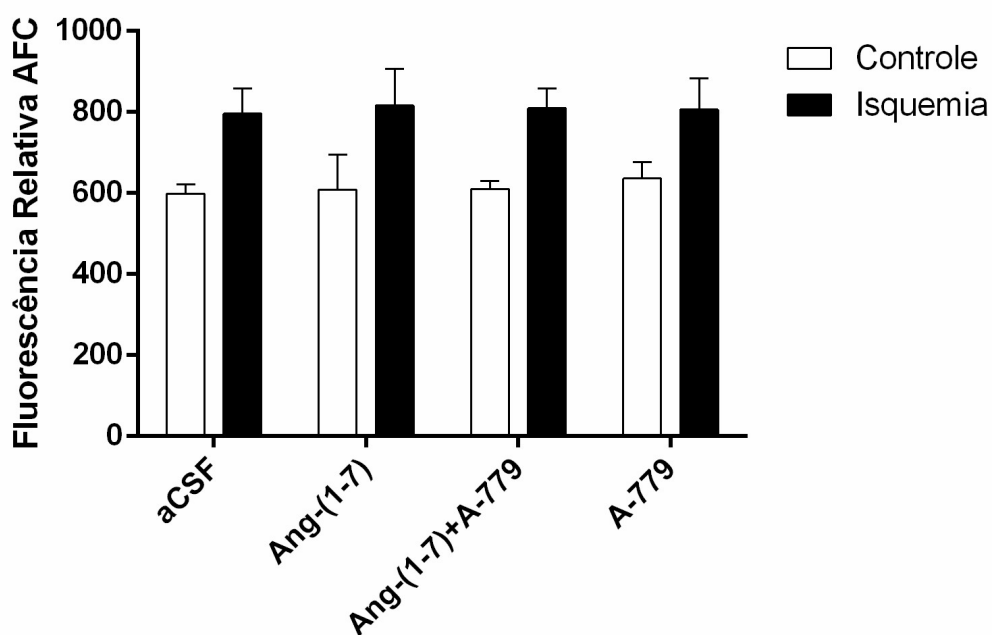


FIGURA 10 Efeito da Ang-(1-7) sobre a atividade de Caspase-8 em fatias de hipocampo após isquemia *in vitro*.

Análise da atividade de caspase-8 através da fluorescência relativa de AFC em fatias de hipocampo após 60min. de isquemia e 240min. de reperfusão. $n = 4$. Two-way ANOVA, *post-hoc Bonferroni*.

5.2.2. Atividade de caspase-9

A análise da expressão de Caspase-9 ativa, em fatias de hipocampo após o protocolo de isquemia *in vitro* revelou níveis, significativamente ($p = 0,009$), menores no grupo Ang-(1-7) isquemia ($112,5 \pm 5,2$), quando comparado ao grupo não tratado – ACSF isquemia ($148,0 \pm 4,2$). A análise revelou ainda, que o efeito da Ang-(1-7) foi abolido no grupo Ang-(1-7)+A-779 isquemia ($147,5 \pm 4,8$), quando comparado ao grupo Ang-(1-7) isquemia ($112,5 \pm 5,2$). Um efeito significativo do protocolo de isquemia *in vitro* e o tratamento com Ang-(1-7) pode ser observado sobre a expressão de caspase-9 ativa (protocolo de isquemia *in vitro*: $F[1,4] =$

48,3, $p < 0,01$; Tratamento com Ang-(1-7): $F[3,4] = 4,8$, $p < 0,01$), bem como uma interação significativa entre os dois parâmetros ($F[3,40] = 3,026$, $p < 0,05$) (figura 11)

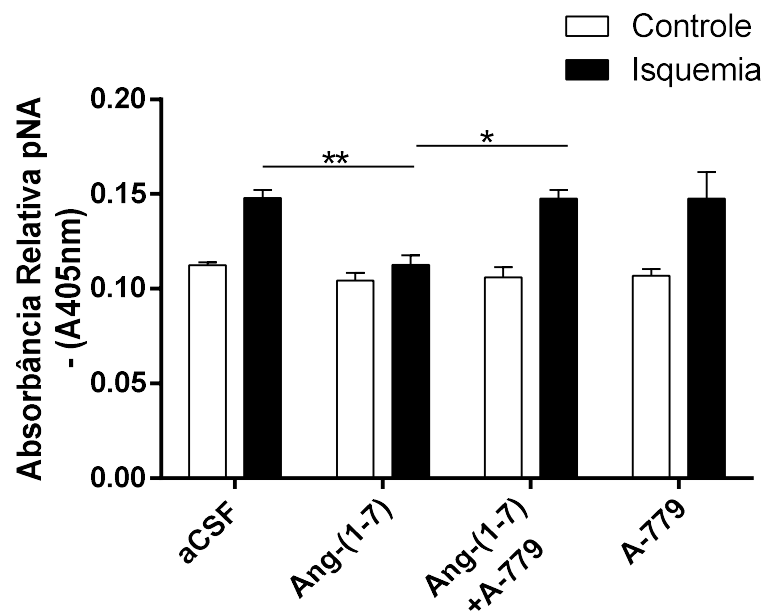


FIGURA 11 Atividade de Caspase-9 em fatias de hipocampo, após isquemia *in vitro*.

Análise da atividade de Caspase-9 (absorbância relativa – 405nm), após 60min. de isquemia e 240min. de reperfusão. Os resultados são expressos como média±EPM dos valores de absorbância. $n=6$. Two-way ANOVA, *post-hoc* SNK, Comparação intragrupos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

5.2.3. Atividade de caspase-3

Tanto o protocolo de isquemia *in vitro*, quanto o tratamento com Ang-(1-7) demonstraram efeitos significantes na expressão de caspase-3 ativa (tratamento com Ang-(1-7): $F[3,3]=6,7$, $p=0,001$; protocolo de isquemia *in vitro*: $F[1,3]=171,2$, $p < 0,0001$). Além de uma interação significativa entre estes dois parâmetros ($F[3,3]=7,9$, $p=0,0003$). A análise revelou que, a expressão de caspase-3 ativa no grupo Ang-(1-7) isquemia é, significativamente menor quando comparado ao grupo não tratado – ACSF isquemia ($2516,5 \pm 175,4$ vs. $4714,9 \pm 344,1$). Além disso

o tratamento com Ang-(1-7)+A-779, não reverte, significativamente, o efeito da Ang-(1-7) (figura 12).

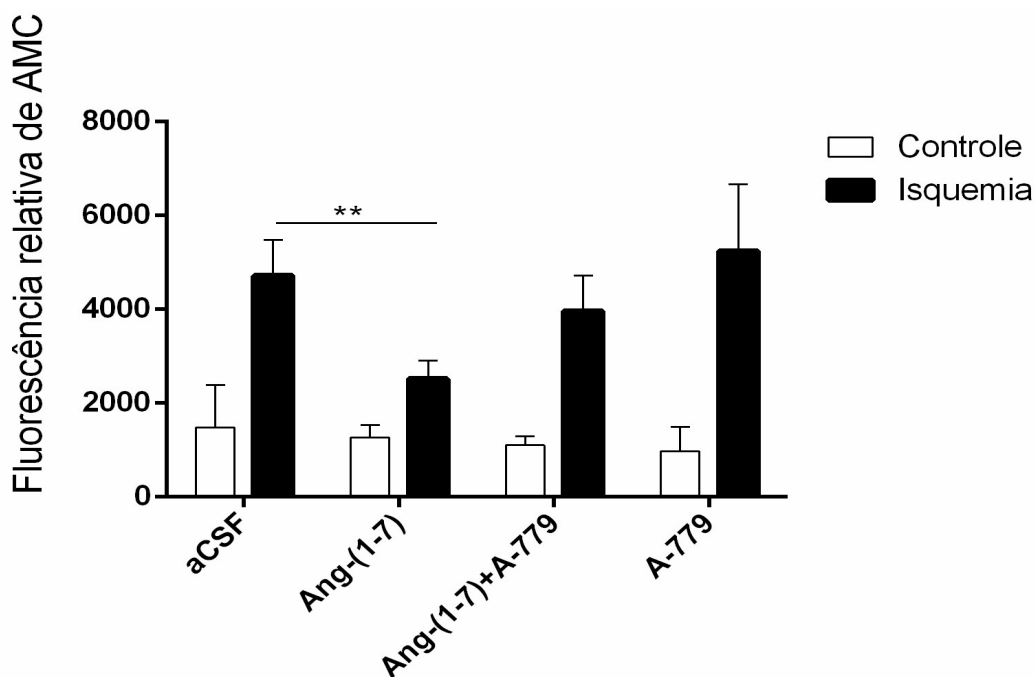


FIGURA 12 Figura x. Efeito da Ang-(1-7) sob a atividade de Caspase-3 em fatias de hipocampo de camundongos após isquemia in vitro.

Análise da atividade de Caspase-3 ativa (fluorescência relativa de AMC), após 60min. de isquemia (POG) e 240min. de reperfusão. Os resultados são expressos como média±EPM dos valores da fluorescência de AMC encontrados. n=6. Two-way ANOVA, *post-hoc Bonferroni*, Comparação intragrupos: **p<0,01.

5.3. Níveis de nitrito [NO₂]

A quantificação dos níveis de nitrito no meio de incubação mostrou uma redução significativa (p<0,01) no grupo Ang-(1-7) isquemia (0,2±0,02µM/mg proteína), comparado ao grupo não tratado ACSF isquemia (0,5±0,06 µM/mg proteína). Além disso, os níveis de [NO₂-] quantificados no grupo Ang-(1-7)+A-779 isquemia (0,5±0,04 µM/mg proteína) foram, estatisticamente, maiores do que aqueles encontrados no grupo Ang-(1-7) isquemia, e semelhantes ao grupo ACSF isquemia. O protocolo de isquemia in vitro, teve efeito significativo (F[1,4]=64,9,

$p < 0,01$), bem como o tratamento com Ang-(1-7) ($F[3,4]=4,2$, $p < 0,05$). Além disso uma interação entre esses dois parâmetros também foi verificada ($F[3,4]=4,7$, $p < 0,01$). (figura 13).

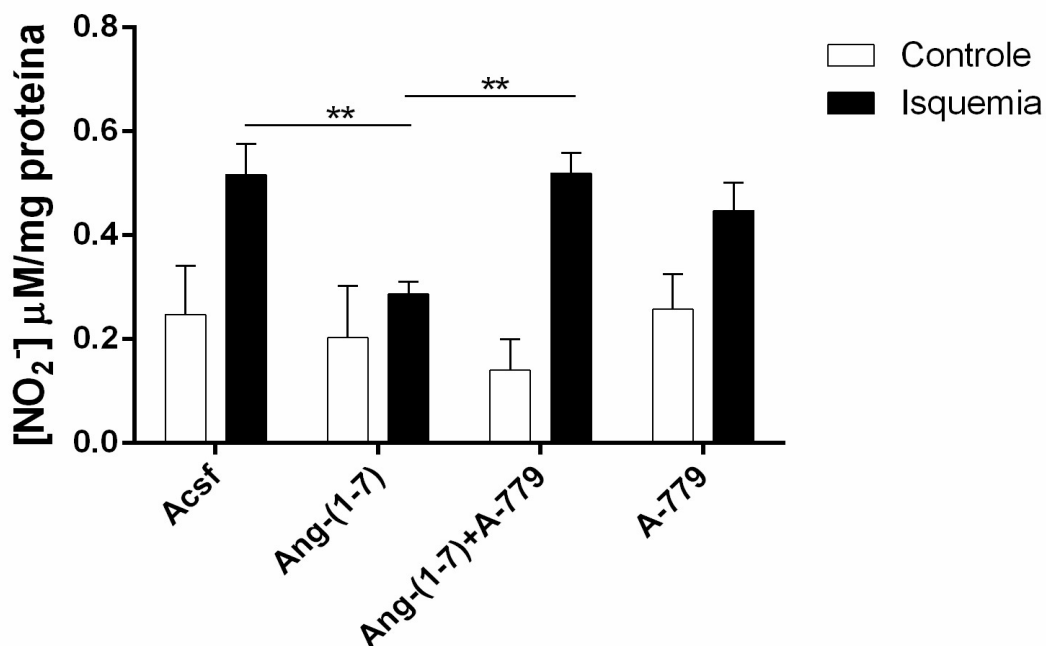


FIGURA 13 Efeito da Ang-(1-7) sobre a concentração de nitrito $[NO_2^-]$.

Análise do nitrito $[NO_2^-]$ acumulado no meio de incubação, 60 min. após o período de isquemia em fatias de hipocampo de camundongos. Os grupos controles foram mantidos em Acsf com glicose 10mM, e uma mistura de gases contendo 95% O_2 e 5% CO_2 . Os resultados são expressos como média \pm EPM dos valores das concentrações de nitrito encontrados. N=6. Two-way ANOVA, *post-hoc* SNK, Comparação intragrupos: ** $p < 0,01$.

5.4. Liberação de glutamato

A análise do glutamato liberado no meio de incubação revelou uma redução, estatisticamente significativa, dos níveis de glutamato no grupo Ang-(1-7) isquemia ($0,4 \pm 0,03$ nmol/mg proteína), em comparação ao grupo não tratado - ACSF isquemia ($1,996 \pm 0,592$ nmol/mg proteína). Já no grupo Ang-(1-7)+A-779 isquemia, os níveis de glutamato ($1,6 \pm 0,2$ nmol/mg proteína) foram, estatisticamente, maiores do que aqueles observados no grupo Ang-(1-7) isquemia ($0,4 \pm 0,03$ nmol/mg proteína); e semelhantes ao grupo ACSF-isquemia

($1,9 \pm 0,5$ nmol/mg proteína). Houve efeito significativo do protocolo de isquemia ($F[1,3]=16,6$), $p < 0,01$; e do tratamento com Ang-(1-7) ($F[2,30]=4,2$, $p < 0,05$), bem como uma interação, significativa, entre estes dois parâmetros ($F[2,3]=5,4$, $p < 0,01$) (Figura 14).

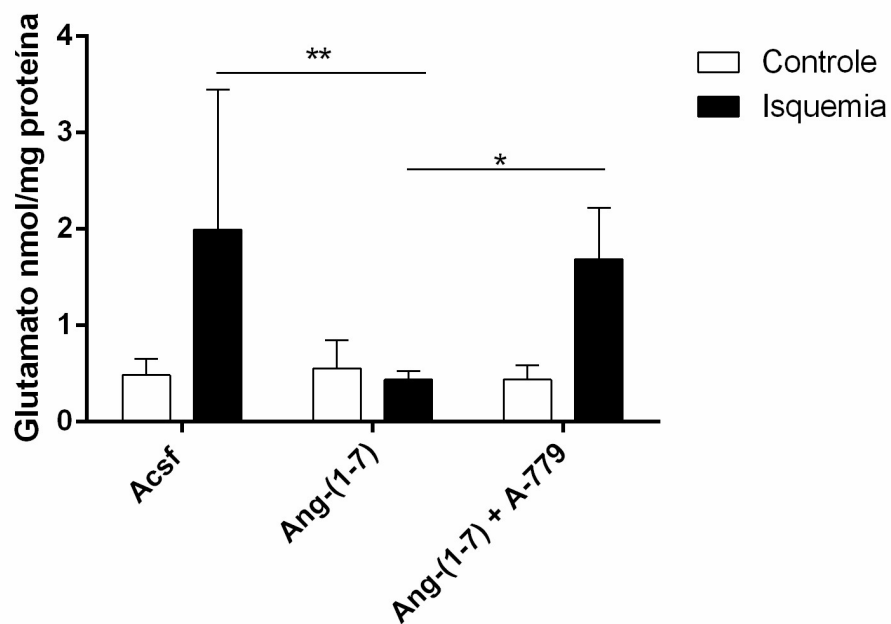


FIGURA 14 Efeito da Ang-(1-7) sobre a liberação de glutamato.

Análise no glutamato acumulado no meio de incubação, avaliado pela conversão do L-glutamato em α -cetoglutarato, na presença de NAD^+ e da enzima dehidrogenase glutâmica (GDH) no meio de incubação, 60 min. após o período de isquemia, em fatias de hipocampo de camundongos. Os grupos controles foram mantidos em Acsf com glicose 10mM, e uma mistura de gases contendo 95% O_2 e 5% CO_2 . Os resultados são expressos como média \pm EPM. $n=6$. Two-way ANOVA, *post-hoc* SNK, Comparação intragrupos: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

6.DISSCUSSÃO

O Sistema Renina Angiotensina (RAS), no cérebro, possui papel regulatório crucial tanto na função fisiológica, quanto na patologia de doenças cerebrovasculares, incluindo AVC isquêmico. Os efeitos deletérios do eixo ECA/ AngII /AT1R na patogênese da isquemia cerebral tem sido bem discutidos em muitos estudos (PAUL et al., 2006; MIYAMOTO et al., 2008; HARAGUCHI et al., 2010). Além disso, recentemente o eixo ECA2/ Ang-(1-7) /Mas, tem sido considerado neuroprotetor diante de um insulto isquêmico, por agir de forma antagônica à principais ações exercidas pelo eixo ECA/ AngII /AT1R(MECCA et al., 2011; JIANG et al., 2012).

A hipertensão é um dos mais importantes fatores de risco para ambos os tipos de AVC (isquêmico e hemorrágico) e a manipulação do SRA através do bloqueadores do receptor AT1 e inibidores da ECA são padrões adotados atualmente no controle da hipertensão. Desta forma a manipulação do SRA ganhou o interesse de pesquisadores, que o consideram um alvo interessante e promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra o AVC (REGENHARDT et al., 2014).

Apesar de o SRA cerebral estar fisicamente separado do SRA dos órgãos periféricos pela barreira hematoencefálica, todos os componentes do SRA, inclusive o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, estão expressos no cérebro. Outrossim, o cérebro é o órgão que possui maior expressão do receptor Mas, em particular estruturas como hipocampo e o córtex piriforme (BADER, 2013). Além disso, estudos comprovaram que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas, sofre regulação após um insulto isquêmico, fazendo com que o níveis de Ang-(1-7) se elevem tanto nos tecidos cerebrais, quanto no soro. Além de aumentar a expressão do receptor Mas (LU et al., 2013).

O protocolo de isquemia *in vitro* tem sido amplamente utilizado como ferramenta, que possibilita a simulação dos eventos moleculares que ocorrem durante e após um insulto isquêmico, através da privação de oxigênio e glicose. Fatias de hipocampo são utilizadas para o estudo de neurotoxicidade induzida por isquemia, e como modelo viável para testar o potencial neuroprotetor de novos agentes terapêuticos (Monette et al. 1998; Leite et al. 2012; Mourão et al. 2014; Jiao Lin Zheng et al. 2014)

Nossos primeiros resultados mostraram que o tratamento das fatias de hipocampo com Ang-(1-7), no momento do insulto isquêmico reduziu a morte celular verificada por dois métodos distintos, após 4 horas de reperfusão. Tal efeito protetor foi completamente abolido quando as fatias foram tratadas com Ang-(1-7)+A-779. Demonstrando assim que o efeito alcançado pela Ang-(1-7), neste modelo, é dependente do receptor Mas.

Estudos na literatura tem avaliado a morte celular após insulto isquêmico, em modelos *in vitro* e *in vivo* utilizando Ang-(1-7). Corroborando nosso trabalho, Jiao Lin Zheng et al, (2014) realizaram um estudo onde submeterem fatias de cérebro de camundongo à privação de oxigênio e glicose, sendo que determinados grupos receberam Ang-(1-7) (10 μ M) e outros receberam Ang-(1-7) + A-779 (10 μ M). Baseado numa marcação com iodeto de propídio (PI), os pesquisadores concluíram que a Ang-(1-7) diminuiu significativamente, o número de células PI-positivas. Além disso o bloqueio do receptor Mas aumentou o número de células PI-positivas, demonstrando que o efeito da Ang-(1-7) foi dependente do receptor Mas.

Utilizando um modelo *in vivo* de isquemia cerebral, onde empregou-se Endotelina-1 (ET-1) para constrição da artéria cerebral média (ACM, ou MCAO em inglês), Mecca et al. 2011 relataram que a infusão i.c.v de Ang-(1-7) (1.1nM; 0,5 μ l h) em ratos, durante sete dias antes, e três dias depois da oclusão da ACM produziu uma redução significativa da área de infarto cerebral (medida três dias após aplicação de ET-1), em comparação ao grupo que recebeu apenas o veículo (ACSF).

Estes estudos utilizaram metodologia *in vivo*, que é bastante útil para estudos do dinamismo das estruturas cerebrais, bem como a participação dos vasos sanguíneos. Os estudos *in vitro*, como o nosso, são necessários para analisar os efeitos de determinado agente, sob uma estrutura isolada. Desta forma, nossos resultados agregam aos estudos citados, mecanismos utilizados pela Ang-(1-7) em fatias do hipocampo, isoladamente, o que pode ser bastante útil para os estudos das respostas moleculares.

O dano neural após insulto isquêmico é devido à privação de oxigênio e glicose, e à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a reperfusão. O aumento do estresse oxidativo, proporcionalmente, também aumenta o influxo de Ca^{2+} na célula, devido à perda da homeostasia dos gradientes iônicos. Tal evento ativa mecanismos pró-apoptóticos e consequentemente leva à morte celular (BROWN; DAVIS, 2002).

Nosso trabalho mostrou que o tratamento com Ang-(1-7) reduziu a expressão de moléculas pró-apoptóticas – caspase 9 e caspase 3. O bloqueio do receptor Mas reverteu o efeito da Ang-(1-7) sobre caspase-9, mas não reverteu completamente o efeito sobre caspase 3. O presente estudo mostrou ainda, que o tratamento com Ang-(1-7) não teve efeito sobre caspase 8, tanto nas condições controle, quanto na isquemia.

Apoptose é definida, classicamente, como morte programada da célula (MPC). Ela desempenha função crucial no desenvolvimento e na homeostasia dos organismos multicelulares (THOMPSON, 1995). Nas células de mamíferos, a apoptose pode ser induzida por uma via extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca é ativada pela estimulação do receptor de morte (DR), na membrana celular. A estimulação deste receptor leva a formação do complexo proteico sinalizador (DISC) que ativa caspase-8. Já a via intrínseca é ativada quando a membrana mitocondrial aumenta a permeabilidade e libera citocromo C no citosol, que leva a ativação de pro-caspase-9. Ambas as vias eventualmente, levam à ativação de caspases efetoras, como a caspase 3 (SCHLEICH; LAVRIK, 2013). A família de proteínas Bcl2 também possuem funções cruciais na regulação dos eventos

apoptóticos. Esse grupo de proteínas inclui membros pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bid) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X1) (YAN; SHI, 2005).

Com o objetivo de investigar o efeitos neuroprotetores da Ang-(1-7), Jiang et al. 2013, utilizaram ratos hipertensos (SHR) em um estudo que avaliou a ação da Ang-(1-7) sobre estresse oxidativo, viabilidade celular e apoptose. O animais foram divididos em grupos que receberam (i.c.v) respectivamente, ACSF, Ang-(1-7) e A-779 por 4 semanas. Os autores mostraram que a infusão i.c.v de Ang-(1-7) (11,1 nmol /0,25µl/h), causa redução significativa na expressão de Bax, e um aumento expressivo dos níveis de Bcl-2. Contudo a administração i.c.v de A-779, não reverteu completamente a ação da Ang-(1-7). Corroborando com nossos resultados, ambas as moléculas estudadas (Bcl2 e Bak), no trabalho citado, participam da regulação intrínseca da apoptose e o bloqueio do receptor Mas não aboliu completamente a expressão destas.

Uma possível explicação para os nossos resultados consiste em considerar que a Ang-(1-7) é capaz de modular a apoptose celular através da via intrínseca, uma vez que não houve efeito significativo sobre caspase-8. Por outro lado, efeito significativo sobre caspase 3 e 9 foi observado. Outra via a ser considerada neste caso é a via independente de caspase, que possui como moduladores moléculas liberadas pela mitocôndria (AIF e EndoG) durante processos que sinalizam morte celular (ORRENIUS et al., 2003). Neste caso não se pode descartar a possibilidade de ação da Ang-(1-7) sobre a expressão de AIF.

O estresse oxidativo tem um papel importante no progresso da isquemia cerebral, uma vez que o cérebro é rico em ácidos graxos poliinsaturados, tornando-o particularmente, vulnerável a ação de radicais livre (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009). É sabido que a infusão i.c.v de Ang-(1-7) diminui significativamente os níveis de MDA – um biomarcador de estresse oxidativo – e também aumenta, consideravelmente, os níveis de SOD – uma enzima que participa da linha de defesa antioxidante. Estes efeitos são completamente abolidos pelo A-779 (JIANG et al., 2012).

Com o objetivo de investigar a ação da Ang-(1-7) sobre o estresse oxidativo, muitos estudos foram desenvolvidos e os resultados permitem concluir que a Ang-(1-7) diminui, significativamente, esse processo (BADER, 2013; BILD; CIOBICA, 2013; JIANG, TENG et al., 2013; BENNION et al., 2015).

Nosso trabalho mostrou que o tratamento com Ang-(1-7) diminuiu, significativamente, os níveis de nitrito [NO₂] após insulto isquêmico *in vitro*. Tal efeito foi revertido pelo tratamento com A-779, demonstrando ser dependente do receptor Mas. Neste ensaio utilizou-se método fluorescente 2,3-diaminonaphtaleno (DAN), que permite mensurar, indiretamente, a quantidade de NO, presente na amostra (LEITE et al., 2012; AIRES et al., 2013).

O papel do NO na patogênese da isquemia cerebral ainda é considerado ambíguo na literatura. A formação de NO pela isoforma eNOS, imediatamente após isquemia cerebral tem demonstrado ser neuroprotetor, uma vez que nesta situação o NO liberado melhora a circulação colateral, ajudando no restabelecimento do fluxo sanguíneo durante os primeiros estágios da fisiopatologia da isquemia cerebral (VELTKAMP et al., 2002; OSUKA et al., 2004). Contudo, com a propagação da isquemia, durante a subsequente reperfusão, a formação de NO pela isoforma iNOS, em micróglia ativadas, aumenta o dano celular, contribuindo portanto, para a injúria irreversível da isquemia cerebral (IADECOLA et al., 1997; MORO et al., 2004). Jiang et al. 2013, mostraram que a infusão i.c.v de Ang-(1-7) aumentou, significativamente, os níveis de NO durante os estágios iniciais da isquemia cerebral. Além disso, o grupo também mostrou significativo aumento da expressão de eNOS, 48 após a oclusão da artéria cerebral média (MCAO). Em um estudo realizado por Mecca et al. 2011, a infusão i.c.v de Ang-(1-7) atenuou a expressão da isoforma iNOS, responsável pela expansão dos danos causados pela isquemia cerebral. Sendo assim, as diferentes formas de regulação pela NOS parece representar parte de mecanismos neuroprotetores da Ang-(1-7), ainda não elucidados.

O NO torna-se neurotóxico quando é produzido em excesso. Uma vez que este pode sofrer reação de oxi-redução numa célula em estado pró-oxidante,

gerando espécies reativas de nitrogênio (ERN), principalmente (ONOO) (GUIX et al., 2005). Sendo assim, levando-se em consideração os nossos resultados, nós acreditamos que a Ang-(1-7) reduz os níveis de óxido nítrico, num modelo in vitro, principalmente pela diminuição da atividade de iNOS. Contudo, sabe-se atualmente, que as células do SNC expressam as três isoformas de NOS, e apesar de utilizarem co-fatores comuns e mecanismos de ação similares, elas são estruturalmente distintas (Simmons & Murphy 1992). Portanto, no nosso trabalho uma ação global da Ang-(1-7) sobre as isoformas de NOS não pode ser descartada, uma vez que a redução dos níveis de NO, previne a formação de ERN. Um resultado antagônico poderia ser esperado, caso o modelo experimental fosse in vivo, uma vez que a presença do sistema vascular alteraria o padrão de liberação de NO, principalmente pela isoforma eNOS.

A isquemia cerebral resulta, basicamente, da redução transiente ou permanente do fluxo sanguíneo cerebral, que é restrito à regiões irrigadas por grandes artérias. O cérebro tem relativamente alto consumo de oxigênio e glicose, e depende, quase exclusivamente, da fosforilação oxidativa para a produção de energia. A interrupção do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a redução ou bloqueio de nutrientes e substratos, particularmente oxigênio e glicose, levam a falhas na manutenção dos gradientes iônicos. Conseqüentemente, canais voltagem-dependentes pré-sinápticos se tornam ativados liberando glutamato na fenda sináptica. Ao mesmo tempo, o processo ativo de recaptção falha em seu papel fisiológico devido a carência energética, e o glutamato se acumula no espaço extracelular (DIRNAGL et al., 1999). Sob despolarização pós sináptica (que pode ser originada pela ativação de receptores glutamatérgicos tipo AMPA, dentre os outros), o Mg^{2+} , que outrora bloqueava os canais NMDA na célula em repouso, são deslocados permitindo assim o influxo de Ca^{2+} . No citosol, o Ca^{2+} é um importante segundo mensageiro e influencia um grande número de ações celulares, exercendo um papel regulatório em processos de proliferação e sobrevivência celular, bem como morte por necrose ou apoptose. Concentrações excessivas de glutamato na fenda sináptica resultam na superestimulação de seus receptores e entrada de Ca^{2+} excessiva no terminal pós sináptica, que somada a

liberação do Ca^{2+} das reservas intracelulares, elevam a concentração de Ca^{2+} acima do limiar ativador de mecanismos regulatórios, ativando portanto mecanismos intracelulares de excitotoxicidade que culminam na morte neuronal (RUGGIERO et al., 2011).

Estudos na literatura utilizaram um método bioquímico para avaliar parâmetros de excitotoxicidade glutamatérgica, empregando-se a reação: Glutamato+NAD(P)⁺ $\xrightarrow{\text{GDH}}$ α -cetoglutarato+NADPH, sendo esta uma forma viável de mensurar a quantidade de glutamato acumulado no meio de incubação (MASSENSINI et al., 1998; LEITE et al., 2012; MOURÃO et al., 2014).

Nosso trabalho mostrou que a Ang-(1-7) foi capaz de reduzir, significativamente, os níveis de glutamato acumulado no meio de incubação de fatias tratadas. Além disso, este efeito foi abolido pelo A-779, o que permite inferir que tal ação é dependente do receptor Mas.

No SNC, a Na^+ , K^+ , ATPase é expressa em altas concentrações e demanda uma cerca de 40-50% do ATP gerado. A integridade desta bomba é fundamental para o equilíbrio eletroquímico através da membrana plasmática, garantindo o estado de repouso; e a regulação da liberação e recaptação de neurotransmissores como o glutamato. Quando ocorre processos que causam depleção energética, como a isquemia cerebral; tanto a liberação, quanto a recaptação de glutamato ficam prejudicadas levando a um acúmulo desse neurotransmissor, e conseqüentemente desencadeia eventos deletérios relacionados à excitotoxicidade (LEES, 1991)

O glutamato possui ação pós-sináptica, bem descrita na literatura, sobre receptores ionotrópicos e metabotrópicos (iGluRs e mGluRs). Os receptores ionotrópicos incorporam canais iônicos que são permeáveis a cátions, embora a permeabilidade ao Na^+ e Ca^{2+} varia de acordo com a família e a subunidade do receptor. O glutamato pode ser neurotóxico quando ocorre a estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos. A degeneração neuronal após um insulto isquêmico cerebral global ou focal, por exemplo, é dependente da ativação

dos receptores AMPA e NMDA, o que leva a entrada excessiva de Ca^{2+} para a célula (MELDRUM, 2000).

O papel do Ca^{2+} na morte celular foi, primeiramente, proposto por FLECKENSTEIN et al., em 1974. Os pesquisadores concluíram que a entrada excessiva de Ca^{2+} em miócitos poderia acarretar os danos observados após um insulto isquêmico. A partir de então, estudos comprovaram que o influxo de Ca^{2+} regula várias funções intracelulares através de cascatas de sinalização dependentes deste íon. Além disso é sabido que, o aumento das concentrações de Ca^{2+} acima do limiar regulatório ativa mecanismos de excitotoxicidade relacionados a apoptose, estresse oxidativo (aumento das concentrações de NO); ativação de fosfolipases, ativação de proteases, importantes para a produção de ROS, levando a morte neuronal (RUGGIERO et al., 2011).

A partir deste trabalho é possível responder alguns questionamentos, mas muitos outros podem ser realizados, o que indica a necessidade de outros estudos para elucidar, mais claramente, os mecanismos envolvidos na neuroproteção pela Ang-(1-7). Estudos in vivo, são importantes para o avaliar o dinamismo das ações de diferentes estruturas frente ao insulto isquêmico, logo, tais estudos são necessários. Além disso, o emprego de animais transgênicos também é uma ferramenta útil para responder questões relacionadas ao receptor e ligações inespecíficas.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que, no modelo experimental proposto o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de proteger fatias hipocâmpais submetidas ao protocolo de isquemia *in vitro*. Como possíveis mecanismos para tal efeito, podemos concluir que a Ang-(1-7) através de seu receptor Mas atua modulando a liberação de glutamato e óxido nítrico. Além disso, é possível concluir que a Ang-(1-7) pode modular a via intrínseca de apoptose promovendo aumento da viabilidade celular.

8.REFERÊNCIAS

AIRES, R. D.; CAPETTINI, L. S. A.; SILVA, J. F.; *et al.* Paraquat Poisoning Induces TNF- α -Dependent iNOS / NO Mediated Hyporesponsiveness of the Aorta to Vasoconstrictors in Rats. *Plos One*, v. 8, n. 9, p. 1–13, 2013.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases : structure , function and inhibition. *Biochem. Journal*, v. 615, p. 593–615, 2001.

ALLEN, C. L. Ã.; BAYRAKTUTAN, U. Topical reviews Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. , v. 4, n. December, p. 461–470, 2009.

ALNEMRI, E. S. Mammalian cell death proteases: A family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 64, n. 1, p. 33–42, 1997. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

BADER, M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: The other side of the coin. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, v. 465, n. 1, p. 79–85, 2013.

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.

BILD, W.; CIOBICA, A. Angiotensin-(1-7) central administration induces anxiolytic-like effects in elevated plus maze and decreased oxidative stress in the amygdala. *J Affect Disord*, v. 145, n. 2, p. 165–171, 2013.

BK, S.; LJUNGGREN, B. Cerebral energy reserves after prolonged hypoxia and ischemia. *Archives of Neurology*, v. 29, n. 6, p. 400–407, 1973.

BRADFORD, H. F.; WARD, H. K.; THOMAS, A. J. Glutamine--a major substrate for nerve endings. *Journal of neurochemistry*, v. 30, p. 1453–1459, 1978.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROWN, G. C. Nitric Oxide Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*, v. 23, n. 3, p. 153–165, 2010.

BROWN, R. C.; DAVIS, T. P. Calcium Modulation of Adherens and Tight Junction Function: a pontencial mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke*, p. 1706–1711, 2002.

CABRAL, N. L.; LONGO, A. L.; MORO, C. H. C.; AMARAL, C. H.; KISS, H. C. Epidemiologia dos acidentes cerebrovasculares. *Arq. Neuropsiquiatria*, n. 55, p. 357–363, 1997.

CÁRDENAS, A.; MORO, M. A.; HURTADO, O.; et al. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Journal of neurochemistry*, v. 74, p. 2041–2048, 2000.

CASTELLANOS, M. *et al.* Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions a potential therapeutic target. *Stroke*, v. 33, p. 982–987, 2002.

CERRATO, B. D. *et al.* Angiotensin- (1 – 7) upregulates central nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research*, v. 1453, p. 1–7, 2012.

CHAPPELL, M.; BROSNIHAN, K.; DIZ, D.; FERRARIO, C. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 28, p. 16518–16523, 1989.

CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico : conceituação e fatores de risco. *Rev Bras Hipertens*, v. 7, p. 372–382, 2000.

CHOI, D. W. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS*, v. 11, p. 465–469, 1988.

CIMAROSTI, H. *et al.* An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neuroscience Letters*, v. 315, p. 33–36, 2001.

CURTIS, D. R.; WATKINS, J. C. Analogues of Glutamic and γ -Amino-n-butyric acids having Potent Actions on Mammalian Neurones. *Nature*, 1961.

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

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. *Oncogene*, v. 22, n. 53, p. 8543–8567, 2003.

DIAS, C. *et al.* Avaliacao da isquemia cerebral focal induzida pela oclusao da arteria cerebral media e a caao neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. , 2000.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view. *Cell Press*, v. 22, n. 9, p. 391–397, 1999.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, v. 55, p. 310–318, 2008.

EKERT, P. G.; VAUX, D. L. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current opinion in cell biology*, v. 17, n. 6, p. 626–30, 2005.

FERREIRA, A. J. *et al.* Therapeutic Implications of the Vasoprotective Axis of the Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Diseases. *Hypertension*, v. 55, n. 2, p. 207–213, 2010.

FLECKENSTEIN, A. *et al.* Myocardial Fiber Necrosis Due Intracellular Ca overload - a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent. Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.*, v. 4, p. 563–580, 1974.

FONNUM, F. Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. *Journal of Neurochemistry*, v. 42, n. 1, p. 1–11, 1984.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, n. ee, p. 829–837, 2012.

FREUND, M. *et al.* Effects of the angiotensin-(1-7) receptor Mas on cell proliferation and on the population of doublecortin positive cells within the dentate gyrus and the piriform cortex. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 24, n. 2, p. 302–308, 2014.

GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin- (1-7). *Carcinogenesis*, v. 25, n. 11, p. 2045–2052, 2004.

GIANI, J. F. *et al.* Angiotensin- (1 – 7) stimulates the phosphorylation of JAK2 , IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT 1 and Mas receptors. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, v. 293, p. 1154–1163, 2007.

GORMAN, A. M. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: Recurring themes around protein handling: Apoptosis Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 12, p. 2263–2280, 2008.

GUIX, F. X. *et al.* The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*, v. 76, p. 126–152, 2005.

GUPTE, M. *et al.* ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 0200, p. 781–788, 2008.

GUY, J. L. *et al.* Identification of critical active-site residues in angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) by site-directed mutagenesis. *FEBS Journal*, v. 272, p. 3512–3520, 2005.

HARA, M. R.; SNYDER, S. H. Cell signaling and neuronal death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 47, p. 117–141, 2007.

HARAGUCHI, T. *et al.* Telmisartan, a partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, improves impairment of spatial memory and hippocampal apoptosis in rats treated with repeated cerebral ischemia. *Brain Res*, v. 1353, p. 125–132, 2010.

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.

HOLLMANN, M. *et al.* Molecular Biology of Glutamate Receptors. *Kidney and Blood Pressure Research*, v. 17, n. 3-4, p. 182–183, 1994.

IADECOLA, C. *et al.* Delayed Reduction of Ischemic Brain Injury and Neurological Deficits in Mice Lacking the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *The Journal Of Neuroscience*, v. 17, n. 23, p. 9157–9164, 1997.

IADECOLA, C.; ZHANG, F.; XU, X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *The American journal of physiology*, v. 268, p. R286–R292, 1995.

JAISWAL, N. *et al.* Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. *Hypertension*, v. 19, p. 1149–1155, 1992.

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

JIANG, T. *et al.* ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in Brain: A Potential Target for Prevention and Treatment of Ischemic Stroke. *Curr Neuropharmacol*, v. 11, n. 2, p. 209–217, 2013.

JIANG, T. *et al.* Angiotensin-(1-7) modulates renin-angiotensin system associated with reducing oxidative stress and attenuating neuronal apoptosis in the brain of hypertensive rats. *Pharmacological Research*, v. 67, p. 84–93, 2013.

JIANG, T. *et al.* Angiotensin-(1-7) Induces Cerebral Ischemic Tolerance by Promoting Brain Angiogenesis in a Mas/eNOS-Dependent Pathway. *Br J Pharmacol*, 2014.

KOH, P. Melatonin Regulates Nitric Oxide Synthase Expression in Ischemic Brain Injury. *J. Vet. Med. Sci.*, , n. 7, p. 747–750, 2008.

KRAMMER, P. H. *et al.* Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol*, v. 7, n. 7, p. 532–542, 2007.

KRAUSE, T. *et al.* Dantrolene – A review of its pharmacology , therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*, v. 59, p. 364–373, 2004.

LAZARONI, T. L. N. *et al.* Neurobiology of Learning and Memory 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.

LEES, G. J. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Research Reviews*, v. 16, p. 283–300, 1991.

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

LI, L. Y. *et al.* Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, v. 412, p. 95–99, 2001.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*, v. 79, p. 1431–1568, 1999.

LIU, H.; LI, J.; ZHAO, F.; *et al.* Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Rev. Neuroscience*, v. 26, n. 1, p. 105–117, 2015.

LJUNGGREN, B.; RATCHESON, R. A.; SIESJO, B. K. Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Research*, v. 73, p. 291–307, 1974.

LU, J. *et al.* The expression of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis are upregulated after acute cerebral ischemic stroke in rats. *Neuropeptides*, v. 47, n. 5, p. 289–295, 2013.

MACHADO, R. D. P. *et al.* Mechanisms of angiotensin-(1-7) - induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, v. 901, p. 994–1000, 2001.

MAGISTRETTI, P. J. *et al.* Cellular Bases of Brain Energy Metabolism and Their Relevance to Functional Brain Imaging: Evidence for a Prominent Role of Astrocytes. *Cerebral Cortex*, v. 6, p. 50–61, 1996.

MARIAN, A. J. The Discovery of the ACE2 Gene. *Circulation Research* , v. 112 , n. 10 , p. 1307–1309, 2013.

MARIO, G.; SANTOS, H. S.; FERNANDES, L. R.; et al. Mas Deficiency in FVB / N Mice Produces Marked Changes in Lipid and Glycemic Metabolism. *Diabetes*, v. 57, n. February, p. 340–347, 2008.

MARKUS, H. Stroke: causes and clinical features. *Medicine*, v. 40, n. 9, p. 484–489, 2012.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Free Radical Biology & Medicine Nitric oxide signaling: Classical , less classical , and nonclassical mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, n. 1, p. 17–29, 2011.

MASSENSINI, A. R. *et al.* Alpha and beta scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on [Na +]_i and [Ca²⁺]_i. *Neuropharmacology*, v. 37, p. 289–297, 1998.

MATOS, M. *et al.* Peptides Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin- (1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides*, v. 31, n. 10, p. 1934–1939, 2010.

MECCA, A. P. *et al.* Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *NIH Public Access*, v. 96, n. 10, p. 1084–1096, 2011.

MELDRUM, B. S. Glutamate and Glutamine in the Brain Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain : Review of Physiology and Pathology 1. , v. 8, p. 1007–1015, 2000.

MIN, H. J.; KAKU, T.; HADA, J.; HAYASHI, Y. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Research*, v. 946, p. 139–147, 2002.

MISKO, T. P. *et al.* A Fluorometric Assay for the Measurement of Nitrite in Biological Samples. *Analytical Biochemistry*, v. 214, p. 11–16, 1993.

MIYAMOTO, N. *et al.* Neuroprotective role of angiotensin II type 2 receptor after transient focal ischemia in mice brain. , v. 61, p. 249–256, 2008.

MONETTE, R. *et al.* A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res Brain Res Protoc*, v. 2, n. 2, p. 99–108, 1998.

MORO, M. A. *et al.* Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *The European journal of neuroscience*, v. 10, p. 445–456, 1998.

MORO, M. A. *et al.* Role of nitric oxide after brain ischaemia. *The Journal Of Neuroscience*, v. 36, p. 265–275, 2004.

MOURÃO, F. A. G. *et al.* Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to in vitro ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. *Journal of Neurochemistry*, p. n/a–n/a, 2014.

MUIR, K. W. *Stroke. Medicine*, v. 41, p. 169–174, 2013.

NASCIMENTO, A. A. *et al.* Immunocytochemical study of the distribution of endocrine cells in the pancreas of the Brazilian sparrow species *Zonotrichia Capensis Subtorquata* (Swainson, 1837). *Braz J Biol*, v. 67, n. 4, p. 735–740, 2007.

NG, K. K. F.; VANE, J. R. The conversion of angiotensin I to angiotensin II in vivo. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, v. 259, p. 188–189, 1968.

NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem*, v. 49, n. 1, p. 50–57, 1987.

NORABERG, J. Organotypic brain slice cultures: an efficient and reliable method for neurotoxicological screening and mechanistic studies. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, v. 32, p. 329–337, 2004.

OLNEY, J. W. *et al.* MK-80 1 Prevents Infant Rat Brain Hypobaric-Ischemic Neuronal Degeneration in. *The Journal Of Neuroscience*, v. 9, n. May, p. 1701–1704, 1989.

ORRENIUS, S. *et al.* Regulation of cell death : the calcium – apoptosis link. *Nature Reviews*, v. 4, n. July, p. 552–565, 2003.

OSUKA, K. *et al.* Modification of Endothelial NO Synthase Through Protein Phosphorylation After Forebrain Cerebral Ischemia / Reperfusion. *Stroke*, p. 2582–2587, 2004.

PAGE, I. H. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *Journal of Experimental Medicine*, v. 71, n. 1, p. 29–42, 1940.

PASSOS-SILVA, D. G.; VERANO-BRAGA, T.; SANTOS, R. A. S. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. , v. 456, p. 443–456, 2013.

PAUL, M.; MEHR, A. L. I. P.; KREUTZ, R. *Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems*. , p. 747–803, 2006.

PEREIRA, M. *et al.* Gonadotropin Stimulation Increases the Expression of Angiotensin- (1 – 7) and Mas Receptor in the Rat Ovary. *Reproductive Sciences*, v. 16, n. 12, p. 1165–1174, 2009.

PIRES, S. L.; GAGLIARDI, R. J.; GORZONI, M. L. Estudo das freqüências dos principais fatores de risco para acidente vascular cerebral isquêmico em idosos . Arquivos de Neuro-Psiquiatria , 2004. scielo .

REGENHARDT, R. W.; BENNION, D. M.; SUMNERS, C. Cerebroprotective action of angiotensin peptides in stroke. Clinical science (London, England : 1979), v. 126, n. 3, p. 195–205, 2014.

ROCHA, I. G. A. R. A. B. DA. Morte Celular por Apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 53, p. 335–343, 2007.

RUGGIERO, R. N. *et al.* Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares , clínicos e filogenéticos. Medicina (Ribeirão Preto), v. 44, n. 2, p. 143–156, 2011.

SACCO, R. L.; ADAMS, R.; ALBERS, G.; *et al.* Guidelines for Prevention of Stroke in Patients With Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. Stroke, v. 37, p. 577–617, 2006.

SAMPAIO, W. O. *et al.* Angiotensin- (1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. Hypertension, p. 185–192, 2006.

SAMPAIO, W. O. *et al.* Angiotensin-(1-7) Counterregulates Angiotensin II Signaling in Human Endothelial Cells. Hypertension, p. 1093–1098, 2007.

SANTOS, R. A S. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. 2013.

SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7). Hypertension, v. 63, n. 6, p. 1138–1147, 2014.

SANTOS, R. A. *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. Hypertension, v. 11, p. 1153–1157, 1988.

SANTOS, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. PNAS, v. 100, p. 8258–8263, 2003.

SCHIAVONE, M. T. *et al.* Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 85, p. 4095–4098, 1988.

SCHLEICH, K.; LAVRIK, I. N. Mathematical modeling of apoptosis. Cell Communication and Signaling, v. 11, p. 44, 2013.

SCHURR, A.; PAYNE, R. S.; LEVY, R. S.; RIGOR, B. M. Understanding cerebral energy metabolism: A key to successful neuroprotection. *Bailliere's Clinical Anaesthesiology*, 1996.

SEMPLE, P. F. *et al.* Angiotensin II and its heptapeptide (2-8), hexapeptide (3-8), and pentapeptide (4-8) metabolites in arterial and venous blood of man. *Circulation research*, v. 39, p. 671–678, 1976.

SIESJÖ, B. K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *Journal of neurosurgery*, v. 77, p. 169–184, 1992.

SIESJÖ, B. K. *et al.* Acid-base changes during complete brain ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, v. 21, n. 11 Suppl, p. III194–9, 1990.

SIQUEIRA NETO, J. I. *et al.* Vasculopatia cerebral na síndrome do anticorpo antifosfolípide primária: relato de dois casos . *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* , 1996. scielo .

SOUBRIER, F. *et al.* Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *Journal of Hypertension*, v. 11, n. 6, 1993.

SOUZA, L. L.; COSTA-NETO, C. M. LPS-Induced Inflammatory Response in Macrophages. *Journal of Cellular Physiology*, , n. July, p. 2117–2122, 2011.

SWANSON, C. J. *et al.* Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov*, v. 4, n. 2, p. 131–144, 2005.

TAN, P. S. P. *et al.* Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 293, p. R2267–R2278, 2007.

TAVARES, A. A. Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Extrado de Kava (Piper Methysticum) em Modelos in vitro de Lesão Celular. Rio Grande do Sul, Brasil, 2003.

THOMAZI, A. P. *et al.* Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: Developmental aspects and protection by guanosine. *Brain Research*, v. 1188, p. 233–240, 2008.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* , v. 267 , n. 5203 , p. 1456–1462, 1995.

THORNBERRY, N. A. Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ*, v. 6, n. 11, p. 1023–1027, 1999.

THORNBERRY, N. A. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1[β] processing in monocytes. *Nature*, v. 356, n. 6372, p. 768–774, 1992.

TIGERSTEDT, R.; BERGMAN, P. Q. Niere und Kreislauf¹. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie*, v. 8, n. 1, p. 223–271, 1898.

VELTKAMP, R. *et al.* Transient Focal Ischemia Increases Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cerebral Blood Vessels. *Stroke*, p. 2704–2711, 2002.

VERANO-BRAGA, T. *et al.* Time-Resolved quantitative phosphoproteomics: New insights into angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells. *Journal of Proteome Research*, v. 11, n. 6, p. 3370–3381, 2012.

VIGNES, M. *et al.* The synaptic activation of the GluR5 subtype of kainate receptor in area CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 36, n. 11-12, p. 1477–1481, 1997.

WANG, K.; HU, X.; DU, C. Angiotensin- (1-7) suppresses the number and function of the circulating fibrocytes by upregulating endothelial nitric oxide synthase expression. *Mol Cell Biochem*, v. 365, n. 79, p. 19–27, 2012.

XIA, H.; LAZARTIGUES, E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *Journal of Neurochemistry*, v. 107, p. 1482–1494, 2008.

XU, P.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 300, p. R804–R817, 2011.

YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of Apoptosis Through Structural Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 21, p. 35–56, 2005.

ZEEVALK, G. D.; NICKLAS, W. J. Evidence that the Loss of the Voltage-Dependent Mg²⁺ Block at the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Underlies Receptor Activation During Inhibition of Neuronal Metabolism. *Journal of Neurochemistry*, v. 59, n. 4, p. 1211–1220, 1992.

ZETOLA, V. H. *et al.* [Stroke in young adults: analysis of 164 patients]. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 59, n. 3-B, p. 740–745, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11593276>>. .

ZHANG, L. *et al.* Requirement of heat shock protein 70 for inducible nitric oxide synthase induction. *Cellular Signalling*, v. 25, n. 5, p. 1310–1317, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* Central administration of angiotensin-(1-7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide synthase expression following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neuropeptides*, v. 42, p. 593–600, 2008.

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 Neurosci Ther*, v. 20, n. 5, p. 452–459, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581232>>. .

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 and Therapeutics*, v. 20, p. 452–459, 2014.

ZHU, H. *et al.* NPM-ALK upregulates iNOS expression through a STAT3/microRNA-26a-dependent mechanism. *NIH Public Access*, v. 230, n. 1, p. 82–94, 2014.

9. APÊNDICE

9.1 Apêndice 1



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 178 / 2014, relativo ao projeto intitulado "MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NEUROPROTEÇÃO PROMOVIDA PELA ANGIOTENSINA(1-7) EM FATIAS DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA IN VITRO", que tem como responsável Andre Ricardo Massensini, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/09/2014. Este certificado espira-se em 24/09/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 178 / 2014, related to the Project entitled "Evaluation of the mechanisms involved in neuroprotection promoted by Ang-(1-7)/Mas axis in brain ischemia", under the supervision of Andre Ricardo Massensini, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/09/2014. This certificates expires in 24/09/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 24/09/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9.2 Apêndice 2

| | |
|--|---|
| Balança eletrônica de precisão decimal | Marte [®] |
| Balança eletrônica de precisão milesimal | BG440 / Gehara ^{LTD A} |
| Agitador magnético | TE-0851 / Tecnal |
| pHmetro digital | PG1800 / Gehara ^{LTD A} |
| Fatiador de tecidos | Tissue Chopper / McIlwain TM Brinkmann Instruments, England |
| Fatiador de tecidos | 1000 plus / Vibratome TM |
| Homogeneizador de tecido | Z359971 / Sigma-Aldrich [®] |
| Centrífuga | 5415R / Eppendorf |
| VDRL Shaker | TS-2000A / Tradelab |
| Banho Maria | TE-054 MAG / Tecnal |
| Banho maria com agitação | BT-25 / Yamato Scientific CO, Japão |
| Espectrofluorímetro | RF-551 / Shimadzu. Kyoto, Japão |
| Leitor de Elisa | Anthos 2010 / Biochrom |
| Pentes Gel 1.5mm | BIO-RAD [®] |
| Cuba Vertical para eletroforese | Mini Protein [®] Tetra Cell / BIO-RAD [®] |
| Cuba de transferência (úmida) | Mini Protein [®] II Cell / BIO-RAD [®] |
| Membrana de polivinilideno (PVDF) | Millipore TM |
| Fonte de energia | Power Pac 300 / BIO-RAD [®] |
| K7 para revelação | American Biosciences Inc. |
| Filme para revelação | GE Healthcare/ Amersham Hyperfilm TM ECL |
| Termômetro | Panvel [®] |
| Placa de elisa (96 wells) | Analítica |
| Espectrofotômetro | Axyo [®] Anthos [®] Hitachinaka [®] |
| Espectrofluorímetro | Varian [®] |
| Microscópio de fluorescência | Axio Imager.M2 / Carl Zeiss |
| Lâminas (26x76mm) | Bioslide |
| Homogeneizador de tecidos | Pellet Pestle [®] Motor |

9.2 Apêndice 2

| | |
|--|---|
| KREBS RINGER HEINSEILT (solução pré-incubação) | NaCl (120) KCl (2) CaCl ₂ (0,5) MgSO ₄ (10) NaHCO ₃ (26) KH ₂ PO ₄ (1,8) Sacarose (200) q.s.p água mili-Q pH=7,4 |
| KREBS RINGER HEINSEILT (solução pré-incubação) | NaCl (120) KCl (2) CaCl ₂ (0,5) MgSO ₄ (10) NaHCO ₃ (26) KH ₂ PO ₄ (1,8) q.s.p água mili-Q pH=7,4 |
| KREBS RINGER HEINSEILT (solução incubação) | NaCl (120) KCl (2) CaCl ₂ (2) MgSO ₄ (1,19) NaHCO ₃ (26) KH ₂ PO ₄ (1,18) BH ₄ (10 µM) q.s.p água mili-Q pH=7,4 |
| Tampão de Lise | H ₂ O Cloreto de Sódio (NaCl) (125) TRIS-HCl (20) pH=7,6 EGTA (10) EDTA (5) Cocktail de inibidor de protease 40µL/mL |
| MIX: KREBS-RINGER-HEPES (KRH) NADP+ GDH | H ₂ O Cloreto de Sódio (NaCl) (124) Cloreto de potássio (4) Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (1,2) HEPES (25) Glicose (10) pH=7,4 |
| Paraformaldeído 4% Buffer 0,1M | H ₂ O NaOH (100) Tampão fosfato (200) pH=7,4 |
| Tampão fosfato (PB - 0,2M) | H ₂ O |

| | | | |
|-----------------------------|---------------|-------|--|
| | | | Na ₂ HPO ₄ (400) NaH ₂ PO ₄ (200) pH=7,4 |
| Solução NADP ⁺ | | | H ₂ O NADP ⁺ (400) |
| Glutamato | Desidrogenase | (GDH) | 50 ui |
| L-Glutamic | Dehydrogenase | | |
| Solução Padrão de Glutamato | Padrão | | H ₂ O |