



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANG-(1-7) PROTEGE FATIAS DE HIPOCAMPO DO CÉREBRO
DE CAMUNDONGOS CONTRA O DANO ISQUÊMICO
MODULANDO O TRÁFEGO DE RECEPTORES DE GLUTAMATO
DO TIPO AMPA**

GABRIELA MARIA DE ABREU GOMES

Belo Horizonte

2016

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

GABRIELA MARIA DE ABREU GOMES

**ANG-(1-7) PROTEGE FATIAS DE HIPOCAMPO DO CÉREBRO
DE CAMUNDONGOS CONTRA O DANO ISQUÊMICO
MODULANDO O TRÁFEGO DE RECEPTORES DE GLUTAMATO
DO TIPO AMPA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

Belo Horizonte

2016

- 043 Gomes, Gabriela Maria de Abreu.
Ang-(1-7) protege fatias de hipocampo do cérebro de camundongos contra o dano isquêmico modulando o tráfego de receptores de glutamato do tipo Ampa [manuscrito] / Gabriela Maria de Abreu Gomes. - 2016.
- 75 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massesini.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.
1. Fisiologia - Teses. 2. Neuroproteção. 3. Hipocampo (Cérebro) - Teses. 4. Sistema renina angiotensina - Teses. 5. Acidentes vasculares cerebrais - Teses. 6. Receptores de glutamato. I. Massesini, André Ricardo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Bloco A4 sala 168/240, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com auxílio das seguintes agências de fomento:

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 178 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Investigação Da Modulação Promovida Pela Ang-(1-7) Na Atividade De Receptores De Glutamato Do Tipo Ampa Em Fatias De Cérebro De Camundongos”, 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 24/11/2015. Este certificado espira-se em 24/11/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 178 / 2012, related to the Project entitled “ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis and modulation of calcium signaling in brain ischemia via AMPAr internalization”, 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 24/11/2015. This certificate expires in 24/11/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 24/11/2015.

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

À minha família: mamãe, papai e ao meu irmão, que sempre me incentivaram a seguir em frente com este sonho de infância...

Vós que não sois ninguém e que nada possuíis, não espereis ser nem apóstolo nem messias. Tende fé e querei proceder em razão de vossa fé. Chegai primeiramente aos meios de ação que são: a influência da posição e o prestígio da fortuna. Em outras épocas fazia-se ouro com a ciência; hoje é preciso refazer a ciência com o ouro. Fixou-se o volátil, é preciso volartizar-se o fixo.

ELIPHAS LEVI, 1858

Agradecimentos

Em meio à comunidade de ateus, eu, diante do poder de liberdade de expressão, agradeço às forças do Universo (forças cósmicas), que me guiam incessantemente neste caminho da ciência. Este parece ser só o começo de uma grande história.

Um eterno obrigado ao meu orientador, que me deu essa oportunidade indescritível de fazer parte do mundo da ciência, que confiou e investiu em mim e, além disso, obrigada por conseguir lidar com meu gênio sutilmente complexo.

À minha família, aos meus pais pelo incentivo constante ao conhecimento, pelo amor incondicional e por ter me dado todo e qualquer tipo de apoio necessário durante toda minha vida; ao meu irmão, por estar sempre ao meu lado, me mostrando a dura realidade do caminho da ciência, sempre me confortando nos momentos difíceis e me estimulando a seguir em frente.

A todos os professores do Núcleo de Neurociências, Bruno, André, Márcio, Juliana por compartilharem conhecimentos, especialmente à Prof.^a Grace por tornar o laboratório mais feliz, divertido e por todas as conversas, principalmente as fitness.

A todos os amigos científicos do laboratório NNC, sem exceção, pela troca de experiências, de protocolos, pelas dicas da vida e por fazerem o ambiente de trabalho um lugar de paz. Um agradecimento especial, ao Vini, ao Léo, à Dra. Ana Flávia e a Laurita, cada um com seu jeitinho fez meus dias mais felizes, me aconselharam e me escutaram. Agradeço também aos amigos de outros labs, que contribuíram imensamente nesta jornada, obrigada Fernandinho pelas conversas, dicas, companhia e carinho; Flávia, por toda disposição para me ajudar sempre e pelas conversas e conhecimentos que trocamos; Dra. Talita, sempre com paciência para me ajudar e dar dicas de experimentos. Muito obrigada.

Às minhas amigas que estiveram sempre comigo, desde 1994, com as quais eu discuto ciência, arte, política, esporte e tudo que se pode imaginar. Obrigada minhas amigas de infância... Por tudo o que sou, por tudo o que serei e por tudo o que somos. Cada momento da minha vida tem uma parte de vocês, cada conquista tem um aprendizado que veio da nossa convivência e assim caminhamos pela longa estrada da vida, buscando sempre conhecimento e virtudes. Obrigada pelo apoio e

pela admiração, vocês são maravilhosas. Obrigada em especial à Let, por ser uma *roommate* tão boa e tranquila, aquele lar sempre foi melhor com você por perto.

À Profa. Fabíola e ao Prof. Thiago, por aceitarem fazer parte da banca e por terem contribuído bastante para que este trabalho ficasse pronto.

A todos os professores e professoras do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia. E aos membros da secretaria de Pós-Graduação, pela competência e atenção.

Finalmente, mas extremamente importante... Nessa jornada científica eu conheci o amor, o amor na sua forma mais pura, um amor sem interesse e sem atração física. Nesses dois anos eu comemoro dois anos de amizade com meu eterno Calixberto, só a sua presença já muda meu humor e faz minha vida mais feliz, obrigada por todo carinho, compreensão e experimentos compartilhados.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
ABREVIações	5
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	7
1.2. ASPECTOS CELULARES DA REPERFUSÃO	9
1.3. AVC E TRATAMENTOS	11
1.4. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL E EXCITOTOXICIDADE	12
1.5. GLUTAMATO E RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS:	17
1.6. RECEPTORES AMPA – ESTRUTURA E FUNÇÃO	18
1.7. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	25
1.8. FUNÇÕES DA ANG-(1-7)	27
1.9. RECEPTOR MAS	30
1.10. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E AVC	32
2. OBJETIVO	35
2.1. OBJETIVO GERAL	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAL E MÉTODO	36
3.1. ANIMAIS	36
3.2. SOLUÇÕES	36
3.3. DISSECAÇÃO E PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS	38
3.4. PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (INSULTO ISQUEMICO IN VITRO)	39
3.5. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À AGONISTA DE RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO AMPA	39
3.6. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	40
3.6.1. <i>LACTATO DESIDROGENASE</i>	40
3.6.2. <i>ETÍDIO-HOMODÍMERO</i>	41
3.7. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO	42
3.8. QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE GLUR1 E GLUR2	42
3.9. ENSAIO DE BIOTINILAÇÃO	44
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS:	46
4.1. ANG-(1-7) AUMENTA A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDAS À ISQUEMIA IN VITRO	46
4.2. ANG-(1-7) AUMENTA A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDAS À ISQUEMIA IN VITRO	47
4.3. ANG-(1-7) AUMENTA A VIABILIDADE CELULAR EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDAS À ISQUEMIA IN VITRO APÓS REPERFUSÃO	48

4.4.	O TRATAMENTO COM ANG-(1-7) DURANTE A ISQUEMIA REDUZ A LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO	49
4.5.	ANG-(1-7) MODULA A QUANTIDADE DE GLUR2 EM FATIAS DE HIPOCAMPO SUBMETIDAS À OGD	50
4.6.	ANG-(1-7) ALTERA QUANTIDADE DE GLUR1	51
4.7.	ANG-(1-7) ALTERA QUANTIDADE CITOPLASMÁTICA DE GLUR1	52
4.8.	ANG-(1-7) ALTERA QUANTIDADE MEMBRANAR DE GLUR2 EM FATIAS DE HIPOCAMPO SUBMETIDAS À OGD 53	
4.9.	ANG-(1-7) PREVINE MORTE CELULAR ESTIMULADA POR AGONISTA AMPA.....	55
4.10.	ANG-(1-7) REDUZ A MORTE CELULAR INDUZIDA POR AMPA EM FATIAS DE HIPOCAMPO	56
5.	DISCUSSÃO	57
6.	CONCLUSÃO	64
7.	BIBLIOGRAFIA.....	65

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é caracterizado por uma diminuição do fluxo sanguíneo, levando a uma completa falta (anoxia) ou a baixos níveis de oxigênio (hipoxia), juntamente com a ausência ou reduzidos níveis de glicose; e esse evento por si só (isquemia) é um evento que causa danos. A isquemia cerebral resulta em uma cascata de eventos metabólicos deletérios, que causam importantes alterações celulares, como rápida diminuição de ATP, perda da integridade da membrana, liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} , perda da homeostase iônica, excitotoxicidade, ativação de enzimas e disfunção mitocondrial. A perda da homeostase iônica durante o processo isquêmico leva a uma liberação excessiva de glutamato, causando a excitotoxicidade glutamatérgica, e por fim a morte neuronal. A expressão do receptor glutamatérgico AMPA é alterada pelo processo isquêmico. Em condições fisiológicas, o receptor AMPA contém a subunidade GluR2, que torna o canal impermeável a íons divalentes, como Ca^{2+} e Zn^{2+} . Durante o processo isquêmico, ocorre a internalização e subsequente degradação da GluR2, aumentando a permeabilidade do canal ao Ca^{2+} . Apesar de ter sido descoberto há mais de 100 anos atrás, o sistema renina angiotensina ainda apresenta um papel chave para o tratamento de várias doenças cardiovasculares. Todos os componentes do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas são expressos no tecido cerebral e desempenham um papel crucial na neuroproteção em casos de isquemia. Vários estudos sugerem que a administração Ang-(1-7) reduz a área de infarto e produz proteção cerebral em modelos de AVC em roedores, porém os mecanismos pelos quais a Ang-(1-7) promove neuroproteção ainda não estão completamente elucidados. O objetivo deste trabalho foi investigar se Ang-(1-7) promove neuroproteção através da modulação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. Para desenvolver este trabalho, fatias hipocâmpais de camundongos foram divididas em grupos testes e controles, com Ang-(1-7) e/ou o antagonista do receptor Mas (A-779), e submetidas à privação de oxigênio e glicose. Posteriormente foram analisadas a viabilidade celular, quantidade total e membranas das subunidades GluR2 e GluR1 do receptor AMPA, e liberação de glutamato. Nossos resultados mostraram que Ang-(1-7) foi capaz de diminuir a morte celular de fatias hipocâmpais submetidas à isquemia *in-vitro*. Como possível mecanismo protetor, verificamos que o tratamento com Ang-(1-7) preveniu a internalização e degradação da subunidade GluR2 do receptor AMPA. Além disso, nosso trabalho também mostrou que o tratamento com Ang-(1-7) reduziu a liberação de glutamato e reduziu a morte celular estimulada por agonista AMPA. Concluímos que o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de proteger fatias hipocâmpais submetidas ao protocolo de OGD, prevenindo a internalização e degradação da subunidade GluR2 do receptor AMPA e, conseqüentemente, a excitotoxicidade glutamatérgica induzida pelo agonista AMPA.

Palavras chave: OGD, isquemia, AMPA, Ang-(1-7), GluR2, neuroproteção

ABSTRACT

Stroke is caused by a decrease in blood flow, which leads to a complete absence of oxygen (anoxia) and low oxygen (hypoxia) together with the absence or low glucose delivery and this event by itself is an event that causes damage (ischemia). Cerebral ischemia results in a cascade of metabolic events that cause important deleterious cellular changes. After ischemic insult neurons may die immediately after injury or until 10 days later. This is due to metabolic alterations, such as rapid decrease of ATP, loss of membrane integrity, release of Ca^{2+} from intracellular stores, increased Ca^{2+} permeability, loss of ionic homeostasis, excitotoxicity, enzyme activation and mitochondrial dysfunction. The loss of ion homeostasis during ischemic process leads to excessive glutamate release, causing glutamatergic excitotoxicity, and finally neuronal death. Expression of glutamatergic AMPA receptor is modified by ischemic process. Under physiological conditions there are AMPARs GluR2-containing, which makes the channel impermeable to divalent ions such as Ca^{2+} and Zn^{2+} . During the ischemic process occurs internalization and subsequent degradation of GluR2, increasing the channel permeability to Ca^{2+} . Although it was discovered more than 100 years ago, the renin angiotensin system further has a key role in treating various cardiovascular diseases. All components shaft ACE2 / Ang- (1-7) / ACE are expressed in brain tissue and play a crucial role in neuroprotection in cases of ischemia. Several studies suggest that the administration Ang-(1-7) reduces infarct area and produces brain protection in stroke models in rodents, but the mechanisms by which Ang- (1-7) promotes neuroprotection are not yet fully elucidated. The aim of this study was to investigate whether Ang- (1-7) promotes neuroprotection by modulating AMPA glutamate receptors. In order to develop this work, hippocampal slices were subjected to OGD protocol, divided into groups tests and controls with Ang- (1-7) and receptor antagonist Mas ,A-779, to evaluate cell viability, AMPA receptor subunit expression, GluR2 and GluR1 total and membrane expression and also glutamate released. Our results show that Ang- (1-7) was able to reduce cell death in hippocampal slices subjected to in vitro ischemia. As a possible protective mechanism, we found that treatment with Ang- (1-7) prevented the internalization and degradation of the GluR2 subunit of the AMPA receptor. In addition, our work also showed that treatment with Ang- (1-7) reduced glutamate release and reduced cell death stimulated by AMPA agonist.

Key words: Ang-(1-7), stroke, AMPA, GluR2, ischemia

ABREVIACES

ACSF	Fluido Artificial Cérebro Espinhal
AIF	Fator Indutor de Apoptose
AKT	Proteína Quinase Serina/Treonina
AMPA	α -amino-3- hidrox-5-metil-4-isoxazol-ácido propinico
Apaf-1	Fator de Ativao de Protease
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Bcl-2	Proteína reguladora de morte celular (família <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BK	Bradicinina
BDNF	Fator Neurotrfico Derivado do Cérebro
Caspase	Cysteine-Aspartic-Acid-Proteases
CREB	Proteína Ligante ao Elemento Responsivo ao AMPc
DAG	Diacilglicerol
DISC	Complexo de Sinalizao Indutor de Morte
EndoG	Endonuclease G
eNOS	xido Nítrico Sintase Endotelial
EthD-1	EtdioHomedmero
FADD	Proteína de Domínio de Morte Associada
FAS-L	Ligante da Proteína de Membrana Fas.
GABA	Acido Gama-Aminobutírico
GDH	Glutamato Desidrogenase
GDNF	Fator Neurotrfico Derivado Da Glia
IAP	Proteína Inibidora de Apoptose
iNOS	xido Nítrico Sintase Induzível
IP3	Inositol 1,4,5-trisfosfato
KRH	Krebs-ringer- HEPES
LTP	Potenciao de Longa Durao
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NOS	xido Nítrico Sintase
nNOS	xido Nítrico Sintase Neuronal
PB	Soluo Tampo Fosfato
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Quinase
PKC	Proteína Quinase C
TNF	Fator de Necrose Tumoral
RAS	Sistema Renina Angiotensina
ACE	Enzima Conversora de Angiotensina
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ANG II	Angiotensina II
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
Ang-(1-4)	Angiotensina-(1-4)
NO	xido Nítrico
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
CaMKII	Cálcio Calmodulina quinase II
GRIP	Proteína de interao com o receptor de glutamato
ABP	Proteína de ligao ao receptor de glutamato
PICK1	Proteína de Interao com cinase C tipo 1

Aogen	Angiotensinogênio
PRR	Receptor (Pro) renina
NEP	Neuroalendopeptidase
PEP	Poliendopeptidase
AT1	Receptor para Angiotensina tipo I
Mas	Receptor Mas para Angiotensina
MrgD	Receptor D acoplado a proteína G relacionado ao MAS
Q/R editing	Edição Glutamina/arginina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
AVM	Malformações Arteriovenosas
FDA	Ativador de Plasminogênio Tecidual
NTS	Núcleo do Trato Solitário
RVLM	Medula Rostralventromedial
CVLM	Medula caudal ventrolateral
PVN	Núcleo para ventricular
TNF-a	Fator de necrose tumoral
IL-1b	Interleucina 1b
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
FDA	Food and Drug Administration
OGD	Oxygen and glucose deprivation
OGD/R	Oxygen and glucose deprivation/Reperfusion

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidente Vascular Cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC), também conhecido com acidente vascular encefálico (AVE), pode ser definido com uma emergência médica que surge da perda da função cerebral, devido a uma interrupção no fluxo sanguíneo. Essa síndrome é iniciada por uma redução transiente ou permanente no fluxo sanguíneo cerebral, que resulta em um estado de baixa oxigenação, levando o tecido à hipóxia (AARTS *et al.*, 2003). Com a interrupção do fluxo sanguíneo em determinadas áreas do cérebro, o tecido falha em atingir sua demanda metabólica e como consequência, ocorre morte celular ou o que é conhecido como infarto.

De acordo com a organização mundial de saúde, 15 milhões de pessoas sofrem de AVC no mundo por ano. Dentre essas pessoas, 5 milhões morrem e 5 milhões ficam permanentemente incapacitadas. As médias europeias chegam a aproximadamente 650 mil mortes causadas por AVC a cada ano. Nos Estados Unidos, esse número chega a 795 mil, fazendo do AVC a principal causa de incapacidade em longo prazo (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) (FALLUJI *et al.*, 2012) e a segunda causa de morte no mundo (LOZANO *et al.*, 2013).

As funções normais do cérebro exigem uma alta taxa metabólica, no entanto, o cérebro não estoca glicose, nutriente necessário para produção de energia, e esse fato torna o cérebro um órgão muito susceptível a qualquer diminuição na disponibilidade de glicose fornecida pela corrente sanguínea.

A forma mais comum de AVC, que constitui 80-85% de todos AVCs, é denominada AVC isquêmico. O AVC isquêmico ocorre quando o fluxo sanguíneo para uma área do cérebro diminui ou está completamente ausente, como resultado de uma oclusão de vasos, geralmente resultante de trombo ou êmbolo (FALLUJI, 2012). O AVC trombótico ocorre quando um coágulo sanguíneo obstrui um vaso. Esse trombo que obstrui o vaso sanguíneo forma-se frequentemente ao redor de uma placa aterosclerótica (BRODERICK *et al.*, 2007). A outra forma de AVC

isquêmico tem como causa a obstrução de um vaso sanguíneo por um êmbolo ou uma partícula viajando na corrente sanguínea, que teve origem em outra região do corpo. Uma partícula é um coágulo de sangue, mas também pode ser formada por outras substâncias, incluindo uma placa, células cancerosas ou aglomerados de bactérias de uma infecção. Outros tipos de AVC isquêmico incluem hipoperfusão sistêmica, ou seja, uma diminuição geral do fornecimento de sangue, muitas vezes como um resultado de choque circulatório ou ataque cardíaco. Além disso, trombose de seio venoso cerebral, um coágulo de sangue dos seios venosos durais responsáveis pela drenagem do sangue do cérebro, também pode resultar em um acidente vascular cerebral isquêmico.

A outra forma de AVC é o hemorrágico, que acomete em torno de 10 a 15% dos casos. O AVC hemorrágico ocorre quando há ruptura de um vaso sanguíneo no cérebro, resultando no extravasamento de sangue para o tecido cerebral e privação de oxigênio e glicose nas regiões ao redor do vaso rompido. A causa mais comum do AVC hemorrágico é a hipertensão não controlada, mas a presença de vasos sanguíneos enfraquecidos, aneurismas e malformações arteriovenosas (AVM), também podem causar o acidente vascular cerebral hemorrágico (CHAVES, 2000).

A diminuição no fluxo sanguíneo leva a uma completa falta de oxigênio (anoxia) ou baixos níveis de oxigênio (hipoxia), juntamente com a ausência ou com baixos níveis de entrega de glicose, e esse evento por si só é um evento que causa danos (isquemia). A reintrodução de suprimento sanguíneo (reperfusão), após um período de isquemia, surpreendentemente causa mais danos ao tecido cerebral. Este fenômeno é chamado muitas vezes de "paradoxo do oxigênio", pois a reintrodução do fornecimento de sangue é necessária para a sobrevivência das células, no entanto, também resulta em mais danos através do estabelecimento de processos como inflamação, estresse oxidativo e morte celular tardia. Apesar do dano causado pela reperfusão do tecido, o objetivo geral, ao cuidar de um paciente que sofreu de acidente vascular cerebral, é restaurar o fluxo sanguíneo tão rapidamente quanto possível, sem causar hemorragia intracerebral (FALLUJI, 2012).

Os processos de isquemia e reperfusão geram dano ao tecido cerebral e as regiões que sofreram danos são geralmente divididas em duas áreas: uma

denominada “core necrótico” e outra denominada “penumbra”. O “core necrótico” é definido como uma área do cérebro irreversivelmente danificada e localizada imediatamente ao redor da área onde ocorreu bloqueio do fluxo sanguíneo (SCHALLER *et al.*, 2004). As células entram em um processo de morte por necrose entre as células vivas vizinhas, sem desencadear uma resposta inflamatória via ativação de células microgliais, e fazem isso devido ao dano físico, químico e osmótico sobre a membrana plasmática. Nessa região pode ser avaliado o volume do infarto, que é um importante determinante do dano neurológico em longo prazo. Essa morte celular desorganizada leva a um acúmulo de tecido morto na região de oclusão do vaso sanguíneo ou ao redor deste, o que depois da invasão microglial e subsequente remoção de detritos, conduz à cicatrização dos tecidos. Em termos de patologia, essas áreas do cérebro não possuem potencial para se recuperar. O volume de infarto é, e tem sido, de grande interesse para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que possam diminuir esse dano no tecido cerebral. (SCHALLER, 2004).

Diferente do “core necrótico”, a região de penumbra pode ser caracterizada como um tecido que é danificado, mas ainda possui células viáveis nas regiões ao redor do core necrótico (SCHALLER, 2004). Apesar da expectativa de vida das células na região de penumbra ser pequena, as células tem energia suficiente para sobreviver por um pequeno período de tempo, mas não suficiente para manter sua função apropriadamente (BARON, 1999). Salvar a área de penumbra é então o principal alvo da terapia aguda para isquemia.

Mais pesquisa experimental é necessária, especialmente no estudo de marcadores bioquímicos e processos bioquímicos envolvidos na morte celular e sua prevenção, a fim de estabelecer o papel de diversas intervenções terapêuticas.

1.2. Aspectos celulares da reperfusão

Após o insulto isquêmico, os neurônios podem morrer imediatamente ou até 10 dias mais tarde. A morte celular tardia é tipicamente vista na região de penumbra, enquanto a morte celular imediata ocorre no “core isquêmico” (JUURLINK *et al.*, 1997).

O período de reperfusão é caracterizado pelo reestabelecimento do fluxo sanguíneo após o processo de isquemia. A recuperação do metabolismo energético durante os primeiros 20 minutos de reperfusão, após 10 minutos de isquemia, é acompanhada por restauração de gradientes iônicos a níveis próximos aos que existiam no estado pré-isquêmico. Apesar das alterações na concentração de Ca^{2+} serem revertidas no período inicial da reperfusão, a recuperação completa requer em torno de 1 a 2 horas. Quando o período de reperfusão é prolongado, como 4 horas após 2 horas de isquemia focal transiente ocorre deterioração de todos os metabólitos energéticos (tabela 1), como diminuição de ATP, fosfocreatina e aumento de lactato (FOLBERGROVÁ *et al.*, 1995). Todas essas informações sugerem que ocorre um desequilíbrio entre o uso e a produção de energia durante os processos de isquemia e reperfusão e esses desequilíbrios são suficiente para iniciar o extenso dano isquêmico.

TABELA 1. Alterações em metabólitos relacionados a energia em tecido cerebral em resposta a isquemia global ou focal.

Isquemia			
Isquemia Focal			
	Isquemia Global	Core	Penumbra
Fosfocreatina	—	—	—
ATP	—	—	—
Nucleotídeos de adenina total	-/-	-	—
Lactato	++	++	++
Reperfusão			
Após isquemia focal			
	Após Isquemia Global	Core	Penumbra
Fosfocreatina	0	-	0
ATP	-	-	-
Nucleotídeos de adenina total	-/0	-	0
Lactato	0	++/0	+/0

*Zero (0) indica nenhuma diferença estatística comparada ao tecido não isquêmico. (-), pequena, mas diminuição não significativa (> 70% do tecido não isquêmico); (-) redução moderada (30-70%); (—) diminuição severa (até 30% do tecido não isquêmico); (+) aumento moderado (menos que quatro vezes do que na condição não isquêmica); (++) o maior aumento (mais de quatro vezes do que no tecido não isquêmico). O uso de símbolos combinados reflete as diferenças entre estudos. Adaptado de SCHALLER, 2004

Diversas alterações celulares ocorrem durante o período de reperfusão: acidose deteriorante, que leva a injúria do tecido cerebral; alcalose pós-isquêmica prolongada, que interfere com a função mitocondrial e formação de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria. A mitocôndria é a principal fonte de produção de ATP na célula e sua integridade é necessária para a contínua manutenção da homeostase energética na célula. A superprodução de ROS pela mitocôndria eleva o consumo de agentes antioxidantes, suprimindo então o sistema de defesa antioxidante e contribuindo para distúrbios no metabolismo energético, que por fim causam apoptose neuronal (WANG, H. *et al.*, 2015).

1.3. AVC e tratamentos

O AVC é responsável por aproximadamente 1 em cada 18 mortes nos Estados Unidos. Além disso, em torno da metade dos sobreviventes necessitam de cuidados em longo prazo. As consequências funcionais e cognitivas dos sobreviventes de AVC resultam em custos altos. Foi estimado que os custos diretos ou indiretos com o AVC foram de aproximadamente \$73,7 bilhões em 2010 (NOORIAN *et al.*, 2014)

O princípio do tratamento para o AVC é simples, inclui restaurar o fluxo para a área afetada o mais rápido possível (“tempo é cérebro”), sem causar hemorragia intracerebral. No entanto, esse objetivo é complicado devido à heterogeneidade da natureza do acidente vascular cerebral e a falta de dificuldade em atingir esse objetivo (FALLUJI, 2012).

Atualmente, o tratamento clínico para o AVC é bastante limitado, existe somente um tratamento clinicamente aprovado para o AVC isquêmico pela FDA (*Food and drug administration*), o ativador de plasminogênio tecidual (tPA, também conhecido como IV rtPA). O tPA atua dissolvendo o coágulo e melhorando o fluxo sanguíneo para a parte do cérebro que sofre privação de fluxo sanguíneo. No entanto, o tPA deve ser administrado dentro de um curto período de tempo, se administrado dentre 3 horas (ou até 4,5 horas para alguns pacientes), o tPA pode melhorar as chances de recuperação do paciente que sofreu AVC, no entanto, menos de 10% dos pacientes consegue chegar ao hospital em tempo hábil para receber o tratamento com tPA (ALLEN *et al.*, 2012). Na tentativa de combater essa

limitação, pesquisadores estão identificando vários mecanismos moleculares alvos na modulação da morte celular isquêmica.

1.4. Acidente Vascular Cerebral e excitotoxicidade

Durante o período de isquemia e reperfusão, a falta abrupta de energia disponível no tecido cerebral desequilibra o processo dependente de ATP, necessário para manter gradientes iônicos críticos para a função celular normal e homeostase iônica. Como consequência da perda de gradiente iônico, níveis excessivos de neurotransmissores são liberados na sinapse. Um neurotransmissor liberado, que possui uma importância crucial, é o glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. O glutamato desempenha um papel importante no crescimento neuronal e axonal, desenvolvimento do cérebro e maturação, e também em processos de plasticidade sináptica fisiológicos e patológicos. O aumento excessivo de glutamato na sinapse é chamado de excitotoxicidade, e esse é um processo patológico que leva ao dano e morte de células do sistema nervoso central (SNC) (LAI *et al.*, 2014).

Além de ocorrer excesso de liberação de glutamato durante isquemia e reperfusão, a função dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), que fazem a recaptação dos aminoácidos excitatórios, como o glutamato, da fenda sináptica para o terminal pré-sináptico, está comprometida devido à perda da homeostase iônica. Dessa forma, os EAATs não são capazes de retirar o glutamato da fenda sináptica e isso prolonga as elevadas concentrações de glutamato na sinapse (CAMACHO *et al.*, 2006). Consequentemente, os níveis elevados de glutamato na sinapse hiperativam os receptores glutamatérgicos como AMPA, NMDA e cainato, o que leva a abertura de canais iônicos e permite o influxo de íons como Na^+ , Zn^{2+} e Ca^{2+} .

Íons de cálcio são importantes mensageiros intracelulares que governam funções celulares como diferenciação e crescimento, excitabilidade da membrana, exocitose e atividade sináptica. Devido ao fato de existirem tantos processos que são controlados pelo Ca^{2+} , os neurônios possuem mecanismos que regulam rigidamente a homeostase de Ca^{2+} , controlando ambos: os níveis de Ca^{2+}

intracelular e a localização de íons Ca^{2+} através de uma complexa interação entre influxo e efluxo de Ca^{2+} , tamponamento de Ca^{2+} e estoque intracelular de Ca^{2+} (ARUNDINE *et al.*, 2003).

A citotoxicidade causada pelo Ca^{2+} , ou seja, o aumento patológico nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , é um mecanismo central envolvido na morte neuronal em muitas doenças neurodegenerativas crônicas e agudas, como a doença de Alzheimer, o mal de *Parkinson*, lesão traumática cerebral e outras (MEHTA *et al.*, 2013)

Neurônios possuem mecanismos para manutenção de níveis citosólicos controlados de Ca^{2+} . No estado de repouso, os níveis de cálcio livre são mantidos em níveis baixos (100nM). Assim, elevações localizadas de Ca^{2+} , que ocorrem na proximidade de um poro do canal de íons ou em locais intracelulares de liberação de Ca^{2+} , podem eficientemente ativar enzimas ou canais iônicos vizinhos (ARUNDINE, 2003) (Figura 1).

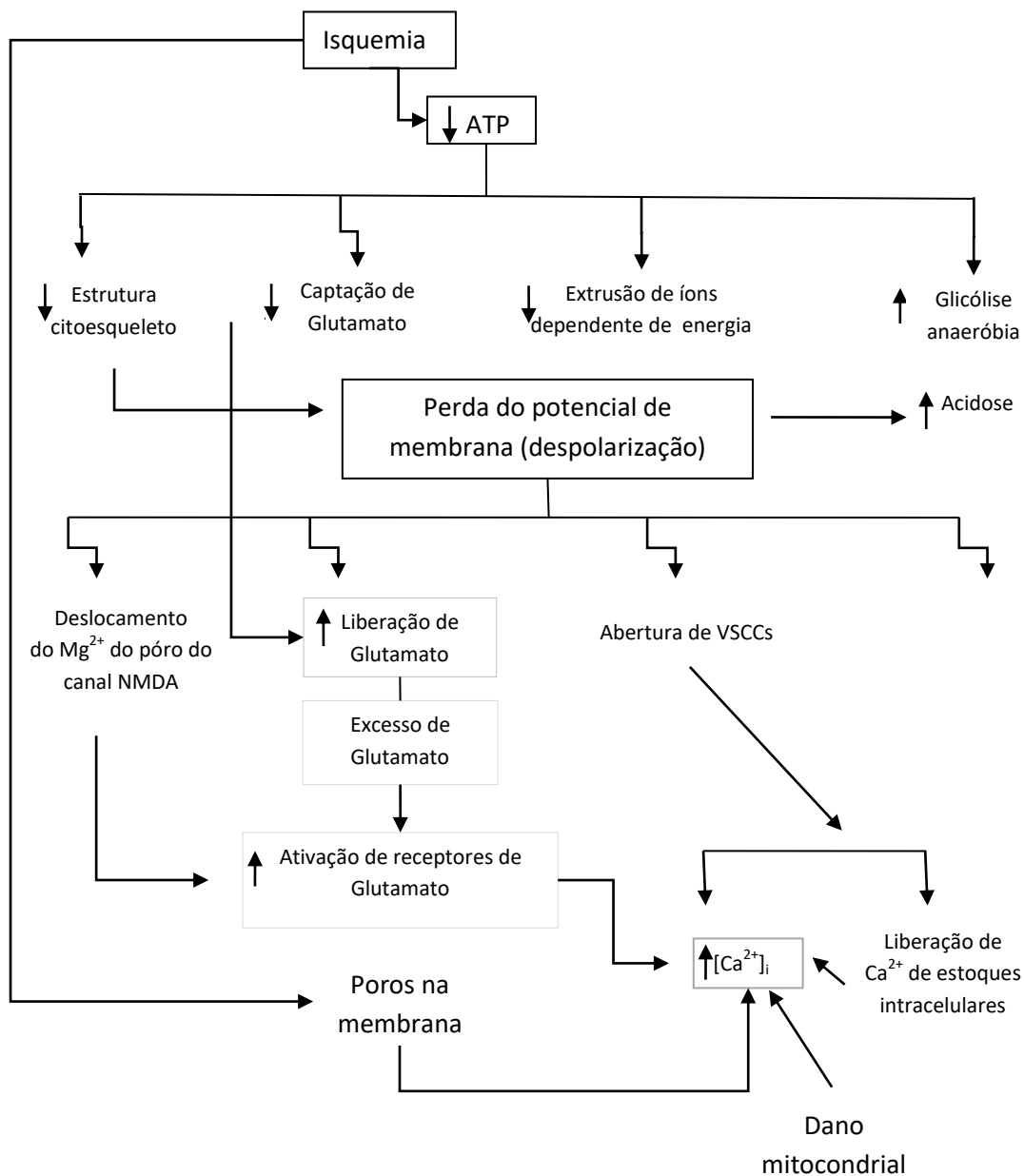


FIGURA 1 Processos de sinalização durante a isquemia.

Sinalizações que levam a elevação de íons Ca^{2+} intracelular como resultado da isquemia. Após a isquemia, a falha energética resulta na síntese inadequada de ATP, levando a perda da homeostase de Ca^{2+} ativada pelos mecanismos que incluem: aumento do influxo de Ca^{2+} , diminuição do efluxo de Ca^{2+} e alteração no tamponamento e sequestro de Ca^{2+} . A falha energética resulta na atividade reduzida de bombas iônicas dependentes de energia (por exemplo Na^+/k^+ ATPases) e redução de atividade dos processos associados como montagem do citoesqueleto, que pode então contribuir para despolarização da membrana e subsequente ativação de mecanismos associados com elevação de Ca^{2+} intracelular e liberação de glutamato. Esses mecanismos incluem operação reversa do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (VSCCs), remoção Mg^{2+} que bloqueia o poro do canal NMDA. Adaptado de (AARTS, 2003)

Neurônios controlam tanto os níveis de Ca^{2+} intracelular quanto a localização de íons de Ca^{2+} . Sob condições fisiológicas, esses processos permitem que haja múltiplas cascatas de sinalização reguladas por Ca^{2+} ocorrendo de forma independente dentro da mesma célula. No entanto, o excesso do influxo de Ca^{2+} ou a liberação dos estoques intracelulares pode elevar a concentração de Ca^{2+} a níveis que excedem a capacidade dos seus mecanismos regulatórios (ARUNDINE, 2003). Apesar de aumentos nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} serem letais, aumentos moderados na $[\text{Ca}^{2+}]$ de 50-200nM podem induzir tolerância imediata ou a longo prazo em isquemia ou outros tipos de estresses (BICKLER *et al.*, 2004).

Além do aumento do influxo de Ca^{2+} através de canais iônicos ativado por glutamato, os estoques intracelulares de Ca^{2+} são liberados da mitocôndria e do retículo endoplasmático (via receptor para inositol trifosfato, IP3) devido à ativação de receptores metabotrópicos pós-sinápticos de glutamato (mGluRs) assim como ativação de outros receptores metabotrópicos, como uma consequência da liberação de acetilcolina, dopamina e serotonina (ARUNDINE, 2003). A elevação excessiva de Ca^{2+} intracelular pode ativar proteases, lipases, fosfatases e endonucleases, que podem diretamente ativar mecanismos que levam ao dano da estrutura celular ou formação de radicais livres de oxigênio que medeiam a morte celular (Figura 2).

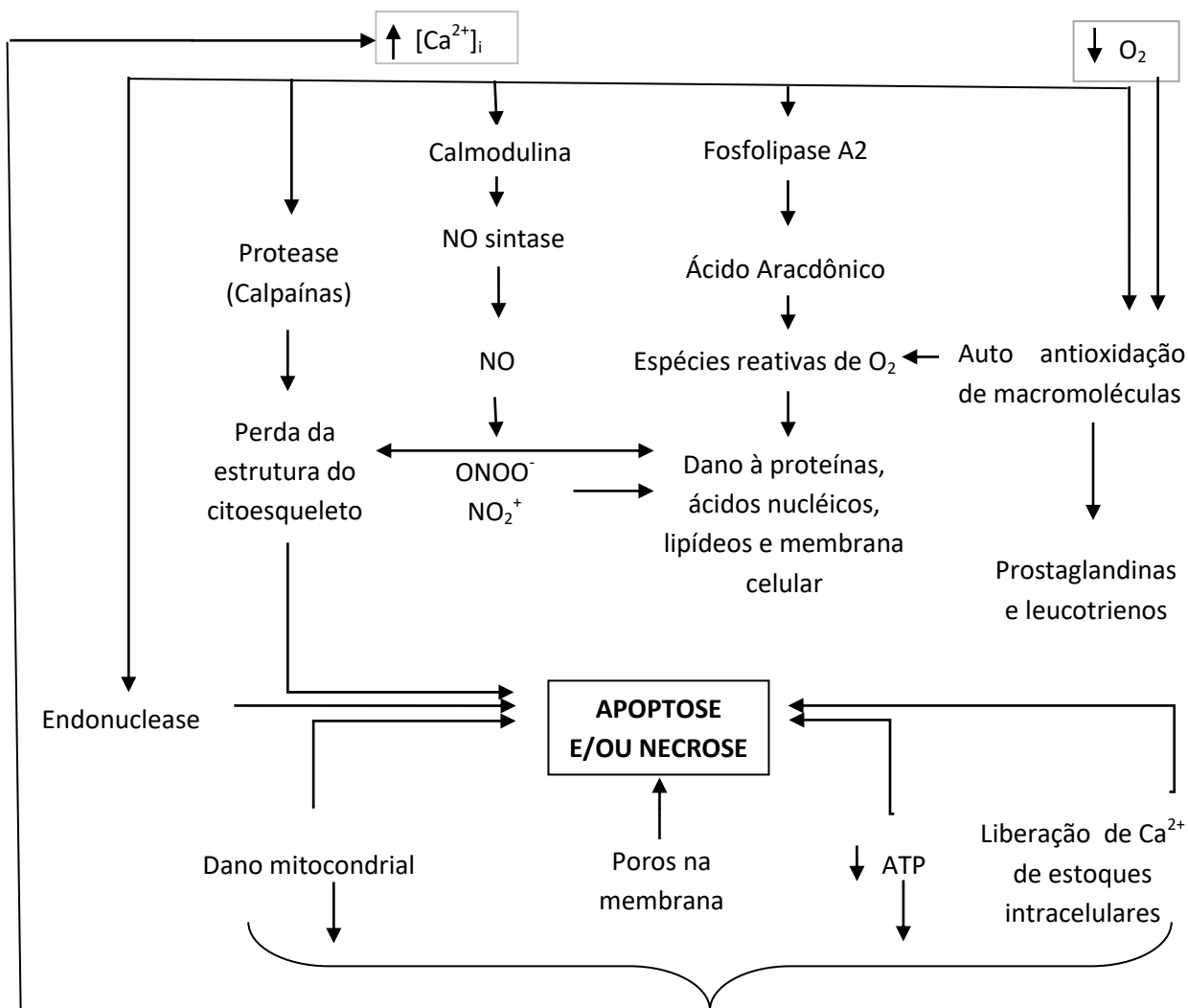


FIGURA 2 Sinalizações que levam a injúria da célula como resultado da elevação em Ca^{2+} intracelular.

Elevações no Ca^{2+} intracelular que surge de diversas fontes incluindo aquelas associadas ao dano mitocondrial, rompimento da membrana e produção de energia (ATP) reduzida leva a ativação de diversas enzimas associadas ao aumento da produção de ROS e posteriormente ao dano à membrana celular, lipídeos e ácidos nucleicos que resultam a morte celular por necrose ou apoptose. Adaptado de (AARTS, 2003).

Um importante regulador dos níveis de Ca^{2+} intracelular é o trocador sódio-cálcio (NCX), que expulsa cálcio usando a força motriz do influxo de sódio. Após a estimulação glutamatérgica, a expulsão de cálcio pelo NCX parcialmente recupera a concentração de Ca^{2+} intracelular de volta aos níveis fisiológicos (WHITE *et al.*, 1995). Outro importante regulador da homeostase do cálcio é a mitocôndria. A mitocôndria recupera a concentração de Ca^{2+} intracelular através de dois mecanismos, (1) capturando ela mesma uma grande quantidade de Ca^{2+} (WHITE *et al.*, 1996, 1997) e (2) facilitando a expulsão de Ca^{2+} dependente de ATP (BUDD *et*

al., 1996). É importante lembrar que White e Reynolds mostraram que a inibição de NCX da mitocôndria previne a recuperação de níveis de cálcio após estimulação glutamatérgica, demonstrando a importância desses processos para recuperação de Ca^{2+} .

Uma das maiores consequências do aumento patológico do cálcio citosólico durante a isquemia/reperfusão surge da superativação de receptores do tipo NMDA e receptores AMPA permeáveis a Ca^{2+} , que leva à abertura de um poro mitocondrial transiente permeável a esses íons. Quando a mitocôndria absorve cálcio em grande quantidade, a organela abre um poro para liberar esse cálcio em excesso. No entanto, além da liberação de Ca^{2+} da mitocôndria, proteínas também são liberadas, particularmente citocromo C, que pode iniciar a morte programada de células (STAVROVSKAYA *et al.*, 2005). Em condições fisiológicas normais, o citocromo C é um componente essencial para a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, responsável pela transferência de elétrons entre os complexos III (Coenzima Q – citocromo C redutase) e IV (Citocromo C oxidase), que é necessário para a produção de ATP. Tipicamente o citocromo C está associado à membrana mitocondrial interna, mas em condições de estresse celular ou em resposta a estímulos pro-apoptóticos, o citocromo C é liberado para o citoplasma.

1.5. Glutamato e Receptores glutamatérgicos:

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos e é responsável pela ativação de vários receptores que são cruciais para processos como neurotransmissão, plasticidade sináptica, desenvolvimento neural e diversos processos cognitivos, como memória e aprendizado (LAI, 2014).

Os receptores para o glutamato são divididos em dois subgrupos. O primeiro grupo de receptores, conhecidos como ionotrópicos, é acoplado a canais iônicos não seletivos, responsáveis pelo controle do fluxo de cátions nas células do sistema nervoso central, são capazes de gerar respostas em milissegundos. Esta classe de receptores é seletivamente ativada por seus agonistas, que incluem o ácido (S)-2-amino-3-(3-hidroxi-5-metiloxazol-4-il) propanóico (AMPA) , o ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) e ácido caínico (KA) que ativa o receptor tipo cainato

(TRAYNELIS *et al.*, 2014). Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) são membros da família de receptores acoplados a proteína G, também tem como ligante o glutamato e são divididos em três grupos: tipo I (mGluR1 e mGluR5), que são acoplados a proteína Gq e predominantemente localizados na região pós-sináptica, tipo II (mGluR2 e mGluR3) que são acoplados a proteínas Gi/Go e estão localizados principalmente na região pré-sináptica e o tipo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) que também estão acoplados a proteínas Gi/Go e estão localizados predominantemente na região pré-sináptica (SHIGEMOTO *et al.*, 1997). A ação coordenada de todos os receptores glutamatérgicos, juntamente com sinais de outros receptores, confere uma grande variedade de funções às células nervosas, que são desempenhadas através de sinalizações celulares como tráfego de receptores, interação entre proteínas, eventos de fosforilação, transcrição e tradução e padrões de ativação temporal, permitindo a fisiologia sináptica normal.

1.6. Receptores AMPA – Estrutura e Função

A regulação do receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) desempenha um mecanismo crucial na transmissão sináptica, contribuindo para processos de plasticidade sináptica e diversas neuropatologias (ISAAC *et al.*, 2007)

Os receptores AMPA (figura 3) surgem de quatro genes, que codificam quatro subunidades, GluR1 a GluR4 (também conhecidas como GluR1-4, GluA1-4 ou GluR-A a D). Essas subunidades se combinam em diferentes estequiometrias para formar um canal iônico catiônico no cérebro, que é ativado por ligante (SHEPHERD *et al.*, 2007).

Os AMPAR estão expressos ao longo do sistema nervoso, tanto em neurônios quanto em células da glia (BELACHEW *et al.*, 2004). A grande maioria desses AMPAR existem no SNC como heterômeros, contendo a subunidade GluR2 (GREGGER *et al.*, 2002). Por exemplo, no prosencéfalo, incluindo hipocampo e neocórtex, as subunidades predominantemente expressas são GluR1 e GluR2, com baixos níveis de GluR3 e GluR4 (SANS *et al.*, 2003; TSUZUKI *et al.*, 2001).

A subunidade GluR2 desempenha um papel crucial na montagem e tráfego do receptor AMPA. Os AMPAR são tetrâmeros formados inicialmente no retículo endoplasmático como dímero de dímeros. O estágio inicial de formação é a dimerização de duas subunidades que é dependente da interação do domínio N-terminal (AYALON *et al.*, 2001). O passo seguinte é uma segunda dimerização mediada por associações em domínios de ligação e em domínios de membrana (GREGGER, 2002).

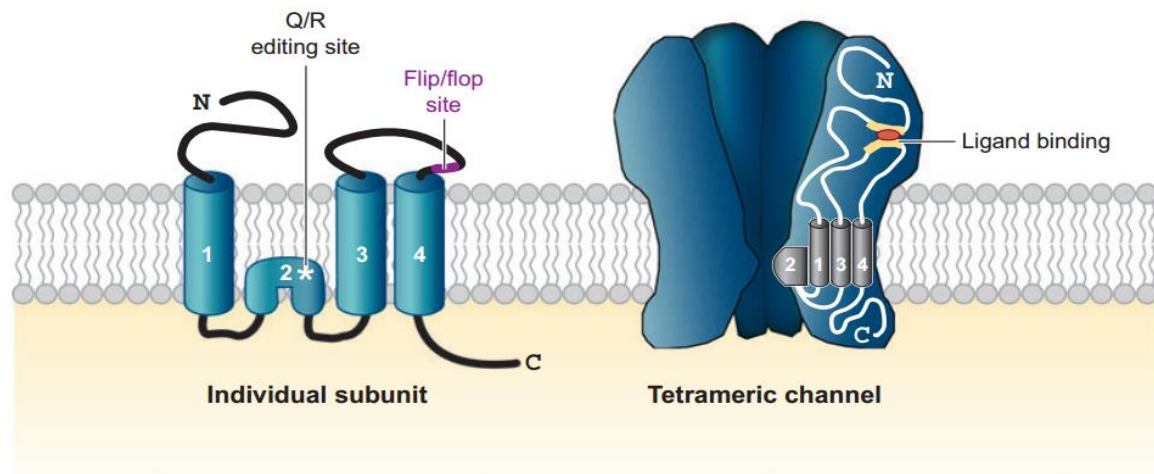


FIGURA 3 Diagrama Esquemático de uma Subunidade do receptor AMPA.

Todas as subunidades têm estrutura e topologia similares. Três dos quatro segmentos hidrofóbicos atravessam a membrana enquanto que um mergulha na membrana a partir da face citoplasmática e contribui para o poro do canal. A região *flip/flop* de *splicing* alternativo e o domínio de ligação PDZ C terminal são mostradas, bem como o Q / R - GluR2, sítio de edição específica. (SHEPHERD, 2007).

Em células onde o GluR2 é altamente expresso, a maioria dos receptores contém essa subunidade e a organização preferida do complexo contendo GluR2 é um heterômero simétrico (MANSOUR *et al.*, 2001). A montagem do AMPAR no retículo endoplasmático (RE) e sua subsequente saída é influenciada por interações específicas de cada subunidade e uma edição da subunidade GluR2, seja no sítio Q/R ou em um segundo sítio (“R/G”) (BRORSON *et al.*, 2004; GREGGER, 2002). Essa regulação da saída do GluR2 do RE resulta em uma alta quantidade de GluR2 no retículo de células onde essa subunidade é altamente expressa (como neurônios corticais piramidais) e pode servir para garantir que a maioria dos receptores contenham o GluR2.

A região extracelular e a região transmembrana das subunidades dos AMPAR são muito similares, variando somente nas caldas citoplasmáticas. Cada subtipo de subunidade compartilha estruturalmente uma grande região N terminal, seguida por

um *loop* reentrante que não atravessa completamente a membrana plasmática, mas, em vez disso, mergulha na membrana a partir do lado citosólico (Fig. 3), criando, assim, um domínio com formação de poros. O *loop* reentrante é seguido por um segundo domínio transmembrana, um *loop* extracelular, um terceiro domínio transmembrana e uma cauda citosólica C-terminal de comprimento variado (BENNETT *et al.*, 1995).

Mecanismos de regulação pós transcricionais, como *splicing* alternativo no domínio de ligação extracelular dos receptores AMPA, geram duas variantes, *flip* e *flop*. Todas as quatro subunidades ocorrem nessas duas versões *flip* e *flop*, que são codificadas por 14 e 15 éxons (SOMMER *et al.*, 1990). As versões *flop* da subunidade GluR2 do receptor AMPA geralmente dessensibilizam muito mais rapidamente que as formas *flip* em resposta ao glutamato (SOMMER, 1990), além disso, as versões *flop* de GluR2 abrem o canal após a ligação do glutamato na mesma taxa que as versões *flip*, mas fecham o canal mais rapidamente (PEI *et al.*, 2009). Os AMPAR também são regulados por eventos de edição de RNA, um processo que envolve desaminação de ribonucleotídeos em *prespliced mRNA* (BASS, 2007).

Apesar de todas subunidades do receptor AMPA compartilharem um alto grau de homologia, a presença ou a ausência da subunidade GluR2 no tetrâmero funcional é o fator mais importante em determinar as propriedades do canal e a sua permeabilidade iônica. A subunidade GluR2 determina a permeabilidade do rAMPA devido ao processo de edição de RNA no qual quase todas as proteínas GluR2 contém um resíduo de aminoácido neutro, glutamina (Q), na região do poro do canal, substituído por um resíduo de arginina (R) carregado positivamente. A substituição Q/R resulta da edição hidrolítica de RNA de uma única base adenosina por uma inosina, através da atividade da enzima adenosina deaminase (ADAR2) (BASS, 2007). Esse processo torna os receptores AMPA que contém a subunidade GluR2 impermeáveis a cátions divalentes (Ca^{2+} , Zn^{2+}) e, além disso, o receptor não é mais sensível ao bloqueio por poliaminas intracelulares (VAUQUELIN *et al.*, 2002).

O sítio de edição Q/R está localizado entre as interfaces da subunidade e afeta a montagem do receptor no retículo endoplasmático favorecendo a heterodimerização com GluR1 em vez da homodimerização com outra subunidade

GluR2 (MANSOUR, 2001). Após a saída do retículo endoplasmático e tráfego para a membrana plasmática, a carga positiva da arginina na região do poro do AMPAR contendo a subunidade GluR2, previne a entrada de cátions divalentes e promove a condutância exclusiva a cátions monovalentes (Na^+)(KOIKE *et al.*, 1997).

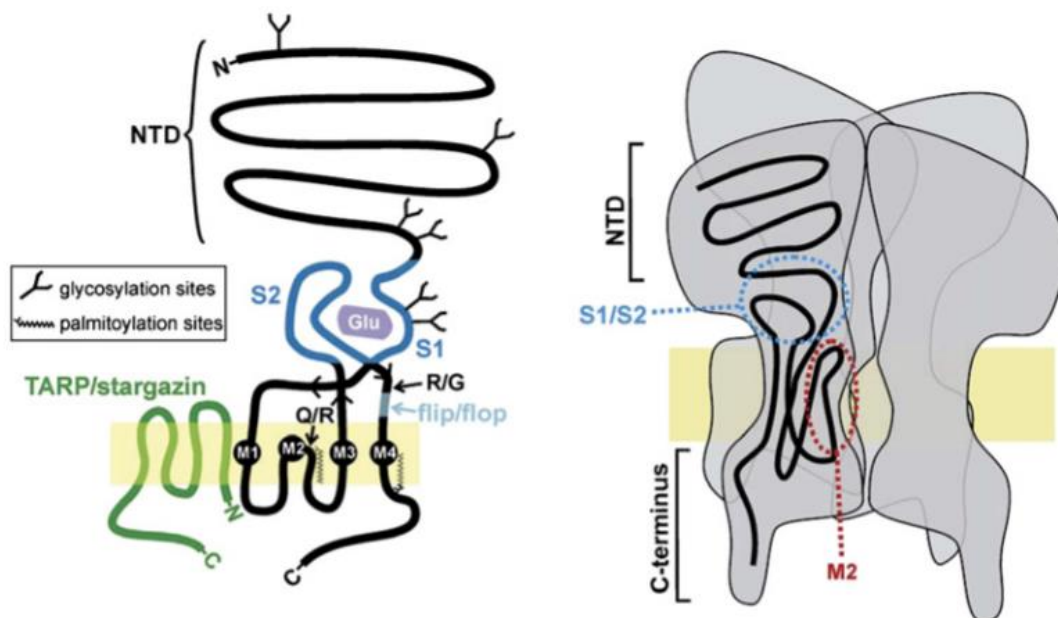


FIGURA 4 Estrutura da Subunidade GluR2 e estrutura geral do Complexo receptor AMPA. Esquema de uma subunidade do receptor AMPA na membrana plasmática. Domínio N-terminal (NTD), domínio de ligação S1 e S2, domínio abrangendo a membrana (M1-M4), sítios de edição de RNA Q/R e R/G, região *flip/flop* de *splicing* alternativo, sítios de glicosilação e palmitoilação estão indicados. A *TARP/stargazin*, proteínas que se assemelham à uma classe de proteínas que atravessam a membrana e tem função de junção celular, também estão demonstradas. (B) Esquema da estrutura 3D do complexo tetramérico do receptor AMPA, com NTD, S1, S2, M2 e regiões C terminais estão indicadas (ISAAC, 2007).

As especificidades transcricionais tem sido estudadas nos genes GluR1 e GluR2 e as regiões promotoras estão sendo mapeadas. O promotor de GluR2 contém o elemento regulatório para o fator de silenciamento transcricional RE1 (REST), que silencia a expressão de GluR2 em células não neuronais (BORGES *et al.*, 2001; MYERS *et al.*, 1998). Sabe-se que sob condições fisiológicas, neurônios hipocâmpais expressam a proteína REST constitutivamente em pequenos níveis, mas que insultos isquêmicos disparam um aumento pronunciado na expressão de mRNA para REST, em neurônios da região CA1. Além disso, *knockdown* para o gene REST, através da administração de oligonucleotídeos antisense em fatias hipocâmpais auxilia na prevenção da morte de neurônios em CA1, induzida por privação de oxigênio e glicose (OGD) (CALDERONE, AGATA *et al.*, 2003).

Estudos têm demonstrado que AMPAR que não contém a subunidade GluR2 contribuem tanto para a função normal do cérebro quanto para algumas patologias (WRIGHT *et al.*, 2012). Além disso, quase nenhum RNA não editado existe no cérebro, em média menos de 1% de todos os RNAs na matéria cinzenta do cérebro codificam GluR2(Q) não editado (KAWAHARA *et al.*, 2003). Neurônios em particular, desenvolveram vias de sinalização específicas para transporte de RNA para dendritos, onde subseqüentes traduções locais podem ocorrer. Nos dendritos, pode-se encontrar toda a maquinaria necessária para a tradução, como ribossomos e fatores de alongamento e iniciação. A grande maioria dos mRNAs transportados para os dendritos são proteínas sinápticas envolvidas com a modulação da transmissão sináptica, incluindo genes de resposta imediata, fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neural factor*, BDNF) e CAMKII. Além disso, alguns mRNAs de subunidades do receptor AMPA são localizados em dendritos, sugerindo que a síntese local das subunidades do receptor AMPA regula a abundância e composição local do receptor (GROOMS *et al.*, 2006; KACHARMINA *et al.*, 2000).

Eventos de fosforilação nas subunidades do receptor AMPA regulam muitas interações entre proteínas envolvidas na estabilização do receptor AMPA na sinapse. Cada evento de fosforilação pode produzir um aumento ou uma diminuição da associação com diversas proteínas envolvidas com a ancoragem do receptor, sua reciclagem e exocitose. Defosforilação de GluR1 na serina 845, um sítio para PKA, e na serina 831, um sítio para CAMKII é importante para a remoção de AMPAR da superfície. Mutações nesses sítios previnem a internalização de AMPAR induzida por ativação de NMDA (LEE *et al.*, 2003).

Já a subunidade GluR2 interage com três proteínas na extremidade C-terminal do sítio PDZ (Figura 5), que contém o resíduo de serina 880. Essas proteínas são: proteína de interação com o receptor de glutamato (GRIP1 - *receptor interacting protein 1*), proteína de ligação ao receptor de glutamato (ABP, também conhecida como GRIP2) e PICK1 (DONG *et al.*, 1997). A fosforilação de GluR2 na serina 880 (Ser880) é dependente de PKC α (CHUNG *et al.*, 2000) e é importante para internalização de AMPAR contendo a subunidade GluR2 em neurônios hipocámpais (CHUNG, 2000). Esse processo de internalização da subunidade

GluR2 acontece em situações de privação de oxigênio e glicose, deixando o rAMPA mais permeável a cátions divalentes e mediando morte celular .



FIGURA 5 Estrutura da subunidade GluR2.

A sequência C terminal detalhada para a isoforma curta da subunidade GluR2 (forma predominante no cérebro) e a isoforma longa da subunidade GluR2. Domínios transmembrana indicados em amarelo, regiões flip/flop de splicing alternativos sombreados; sítios de edição, palmitoilação, fosforilação e interação entre proteínas estão indicados. (ISAAC, 2007)

A fosforilação do GluR2 na Ser880 rompe a interação GluR2-GRIP, uma interação que importante para a ancoragem dos AMPAr ao domínio pós-sináptico (MATSUDA *et al.*, 2000). Esse rompimento promove então a ligação de PICK1 à subunidade GuR2 (CHUNG, 2000), que diminui os níveis de GluR2 através do aumento da endocitose e atraso na reciclagem (LU, W. *et al.*, 2005; TERASHIMA, A., 2004; TERASHIMA, AKIRA *et al.*, 2008). O mecanismo preciso através do qual PICK1 leva a diminuição da expressão de GluR2 na membrana celular continua impreciso, com dados indicando um papel de PICK1 em promover internalização, prevenir reciclagem ou a combinação de ambos. No entanto, a noção de que PICK1 está intimamente envolvida na expressão membranar de GluR2 está de acordo com a literatura publicada. A privação de oxigênio e glicose (OGD) induz morte celular tardia em neurônios hipocâmpais via AMPAr permeáveis a Ca^{2+} e Zn^{2+} (CHOL, 1995) (TANAKA *et al.*, 2000). Em 2009 o grupo de Dixon mostrou que AMPAr que não contem a subunidade GluR2 surgem durante o processo de OGD como resultado da interação PICK1-PDZ e estão envolvidos na morte celular tardia (DIXON *et al.*, 2009b), dessa forma foi demonstrado o papel crucial de PICK1 em resposta a privação de oxigênio e glicose que resulta em transmissão sináptica alterada e morte neuronal.

Em 2015, Beske, et. al. demonstraram que o aumento da atividade da enzima NADPH oxidase, durante a reperfusão de fatias de hipocampo submetidas ao protocolo de OGD está envolvido com aumento da fosforilação da serina 880 da subunidade GluR2, que facilita sua internalização, e também com diminuição de

proteínas de ancoragem de GluR2. Além disso, também foi demonstrado que a maquinaria responsável pela endocitose do receptor AMPA está aumentada durante o processo de OGD/R (BESKE *et al.*, 2015)

No hipocampo, receptores GluR2 ciclam continuamente e ABP/GRIP e PICK1 estão envolvidas em internalização e reciclagem. A endocitose do GluR2 requer dissociação do GluR2 de ABP/GRIP. A interação de GluR2 com PICK1 é precedida pela ativação da PKC alfa (PKC α). Essa ativação de PKC α , que ocorre devido a aumento de Ca²⁺, leva a mudanças conformacionais que expõe o sítio de ligação do domínio PDZ da proteína PICK1 (PEREZ *et al.*, 2001). A Fosforilação de GluR2 na serina 880 é dependente do tráfego de PKC α para a membrana plasmática via PICK1, a qual interage com o domínio *Bin-Amphiphysin-Rvs* (BAR) da proteína GRIP1, conseqüentemente o complexo PICK1-PKC α se aproxima da calda C-terminal da subunidade GluR2 (LU, W., 2005). Após a fosforilação de GluR2, a interação GluR2-GRIP é quebrada e a interação GluR2-PICK1 é favorecida (Figura 6). Conseqüentemente, ocorre a remoção de GluR2 da superfície da membrana, um processo que pode ser um mecanismo importante pelo qual neurônios aumentam a sua excitabilidade basal, através do aumento na permeabilidade ao cálcio via AMPAr que não contém a subunidade GluR2.

Uma possível forma do receptor AMPA mediar o influxo de íons está relacionada ao seu acoplamento a cascatas de sinalização de segundos mensageiros neurotóxicos via interações com proteínas submembranares. (ARUNDINE, 2003).

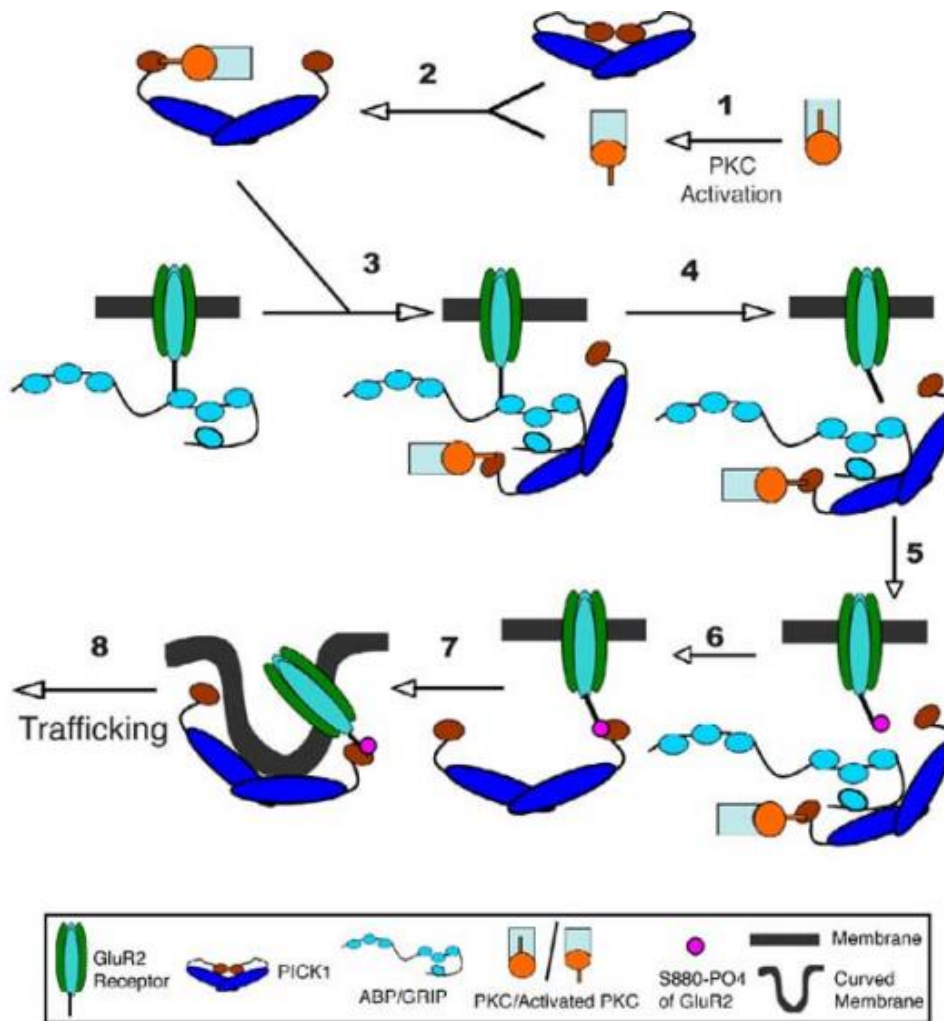


FIGURA 6 Modelo para a interação PICK1-ABP/GRIP no tráfego de Receptores AMPA.

Receptores GluR2 estão ancorados na sinapse e nas membranas intracelulares por intermédio das proteínas ABP/GRIP, mas ciclam entre a membrana e o citoplasma em associação com PICK1. O tráfego de receptores GluR2 ancorados a ABP/GRIP requer interação entre PICK1-ABP/GRIP. Ativação de PKC α (1) causa ligação de PKC α ao domínio PDZ PICK1, essa ligação rompe a interação PDZ-BAR PICK1 e leva à exposição do domínio PICK1 BAR (2). O complexo PICK1-PKC α tem como alvo o complexo ABP/GRIP-GluR2 através da interação do domínio BAR exposto com a sequência Br de ABP/GRIP (3). PICK1 compete com ABP/GRIP pela interação com GluR2 (4). PKC α fosforila S880 do GluR2, GluR2 fosforilado na S880 não consegue mais se ligar a ABP/GRIP (5), mas é capaz de se ligar a PICK1 (6). O domínio PICK1 BAR direciona o complexo PICK1-GluR2 para a membrana curvada (7), onde os receptores GluR2 desgrudam da membrana plasmática e internalizam ou são direcionados para uma membrana externa antes da sua inserção na sinapse (8). (LU, W., 2005).

1.7. Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (RAS) é um sistema de hormônios peptídeos composto por várias enzimas, peptídeos ativos e inativos, que juntos desempenham um papel importante na fisiologia, regulando classicamente o sistema cardiovascular, pressão sanguínea, volume de homeostase e crescimento celular. A

sinalização do RAS inicia-se com o angiotensinogênio, produzido no fígado e hidrolisado pela renina das células justaglomerulares dos rins, para produzir o decapeptídeo biologicamente inativo, a angiotensina-I (ANG-I). A ANG-I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo biologicamente ativo, a ANG II. O angiotensinogênio é a proteína precursora do principal efector do RAS, ANG II. A ANG II é gerada pela ablação de dois aminoácidos carboxi-terminais da ANG I pela principal ECA, associada ao endotélio (SOUBRIER *et al.*, 1993).

Apesar de ter sido descoberto há mais de 100 anos atrás, o RAS ainda apresenta um papel chave para o tratamento de várias doenças cardiovasculares. Nas décadas recentes, com novas técnicas de biologia molecular, aconteceram mudanças significativas na visão desse sistema e um novo eixo, ACE2/ANG-(1-7)/ReceptorMas foi descrito e estabelecido. Em 1988, Santos e cols. descreveram a formação do heptapeptídeo Angiotensina (Ang)-(1-7) através da clivagem da Ang I pela enzima conversora de angiotensina, como uma via independente (SANTOS, R. A S *et al.*, 1988). No mesmo ano, Schiavone e cols. publicaram o primeiro artigo sobre as ações biológicas desse heptapeptídeo *in vitro*, liberando vasopressina de um explante de hipotálamo-neurohipófise (SCHIAVONE *et al.*, 1988). Um ano mais tarde, Chappell e cols. identificaram a presença do peptídeo no cérebro (CHAPPELL, M. *et al.*, 1989) e logo após, Campagnole-Santos e cols. descreveram as primeiras ações *in vivo* da Ang-(1-7) usando micro injeção no núcleo do trato solitário de ratos anestesiados (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989). Esses foram os primeiros estudos que apontaram a Ang-(1-7) como peptídeo biologicamente ativo.

No ano 2000, dois grupos identificaram um novo membro da família ECA, a enzima conversora de Angiotensina 2 – ECA2. Essa monocarboxipeptidase remove o aminoácido leucina da região C-terminal da Ang I para formar o peptídeo biologicamente ativo Ang-(1-9) (DONOGHUE *et al.*, 2000), o qual é subsequentemente clivado para gerar o peptídeo vasodilatador Ang-(1-7), pela ECA ou pela endopeptidase neutra. A ECA2 também pode metabolizar diretamente Ang II para gerar Ang-(1-7), através da clivagem do aminoácido C-terminal fenilalanina (VICKERS *et al.*, 2002). A Ang-(1-7) é o principal produto da degradação da Ang II

pela ACE2 e tem efeitos opostos ao da Ang II. A Ang-(1-7) se liga ao receptor Mas (SANTOS, ROBSON A S *et al.*, 2003) e promove vasodilatação, efeitos anti-proliferativos e anti-hipertróficos (Ferrario 2006; Iwata et al. 2005). Diversas evidências indicam que com a clivagem da Ang II em Ang-(1-7), a ECA2 desempenha um papel primordial em contrabalançar as ações vasoconstritoras do eixo ACE/ANG II/AT1 e pode trazer benefícios para o sistema cardiovascular (LIU, G. C. *et al.*, 2012). Alguns efeitos terapêuticos periféricos do novo sistema ACE2/ANG-(1-7)/receptor-Mas envolvem seu papel em hematopoiese e diferenciação celular, controle de funções do sistema reprodutivo, efeitos protetores em patologias oculares, anti-nocicepção dose-dependente, dentre diversos outros (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016).

1.8. Funções da ANG-(1-7)

O primeiro estudo envolvendo o peptídeo ANG-(1-7) no sistema nervoso central (SNC) foi de Fitzsimons (1971) mostrando que diferentemente da ANG II, a ANG-(1-7) não tem efeito dipsogênico quando injetado em cérebro de ratos. Posteriormente, estudos de imunohistoquímica localizaram ANG-(1-7) em corpos de células neuronais e tratos de fibras do núcleo magnocelular no hipotálamo de ratos (CHAPPELL, M. C. *et al.*, 1989). A Ang-(1-7) desempenha funções em diferentes órgãos e tecidos, em células endoteliais por exemplo, a ANG-(1-7) estimula liberação de óxido nítrico através da fosforilação de Akt, uma serina treonina quinase, induzindo a ativação de NO sintase endotelial e inibindo produção de ROS (SAMPAIO *et al.*, 2007); nos rins, ECA2 está altamente expressa na borda em escova de células tubulares proximais (HAMMING *et al.*, 2004) e a ativação do receptor Mas parece ser protetor em diferentes patologias renais, além disso, Ang-(1-7) também está envolvida com a função normal dos rins, influenciando reabsorção de sódio (FERRARIO *et al.*, 2010); no hipotálamo de ratos, a Ang-(1-7) diminui a liberação de norepinefrina (GIRONACCI *et al.*, 2000); além disso a Ang-(1-7) também atua inibindo o crescimento de células musculares lisas após injúria e (STRAWN *et al.*, 1999) e reduzindo a formação de trombos (KUCHAREWICZ *et al.*, 2002)

A Ang-(1-7) também produz efeitos no sistema nervoso central, são observadas respostas depressoras quando a Ang-(1-7) é administrada no núcleo do trato solitário (NTS) e no núcleo dorsal motor do nervo vago (CAMPAGNOLE-SANTOS, 1989). O NTS serve como o primeiro local de chegada da informação originária de barorreceptores localizados nas artérias carótidas e arco aórtico, enquanto o núcleo motor dorsal serve como um núcleo de controle do tônus parassimpático (CHAPLEAU *et al.*, 2001). Estudos recentes estão focando no papel do eixo ACE2/Ang-(1-7)/Mas em doenças cerebrovasculares.

A ativação do receptor Mas com a administração crônica ou aguda de Ang-(1-7) aumenta o fluxo sanguíneo cerebral e o antagonismo seletivo de Ang-(1-7) diminui o fluxo sanguíneo (SAMPAIO, 2007). Esse aumento no fluxo sanguíneo pode ser explicado por evidências que demonstram que a administração central de Ang-(1-7) logo após o acidente vascular cerebral aumenta os níveis de bradicinina no cérebro e aumenta a expressão dos receptores de bradicinina (LU, J. *et al.*, 2008). Além disso, a liberação de óxido nítrico (NO) e o aumento na expressão da NO sintase endotelial estão aumentadas em tratamentos com Ang-(1-7) (ZHANG *et al.*, 2008). Vários estudos sugerem então que a administração crônica central de Ang-(1-7) reduz a área de infarto e produz proteção cerebral em modelos de AVC em roedores. Juntos esses dados sugerem um potencial mecanismo de neuroproteção mediado por Ang-(1-7), estimulando Mas e subsequente liberação de BK, levando a estimulação de receptores Bk e liberação de NO, o qual pode aumentar a reserva cérebro vascular durante um insulto isquêmico (LU, J., 2008).

Alguns agonistas do receptor Mas, como AVE0991 e HP β CD/Ang-(1-7) também estão sob investigação. O AVE0991 foi o primeiro análogo oralmente ativo da Ang-(1-7) capaz de mimetizar os efeitos da Ang-(1-7) (WIEMER *et al.*, 2002). Os efeitos protetores do AVE0991 são qualitativamente comparáveis aos da Ang-(1-7) no endotélio de vasos sanguíneos (FARIA-SILVA *et al.*, 2005). Recentemente, Lula *et al.* tem proposto o complexo Ang-(1-7) com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), que forma um complexo estável com a Ang-(1-7), como uma possível formulação para administração oral de Ang-(1-7) com aumento na sua meia vida (LULA *et al.*, 2007)

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 (Figura 7). Além disso, o cérebro é o órgão que possui a maior expressão do receptor Mas, em particular no hipocampo e córtex piriforme. Estudos de imunohistoquímica mostraram a presença de Ang-(1-7) nos corpos celulares de neurônios e mostraram também que os vasos sanguíneos do cérebro são importantes sítios para formação e ação da Ang-(1-7).

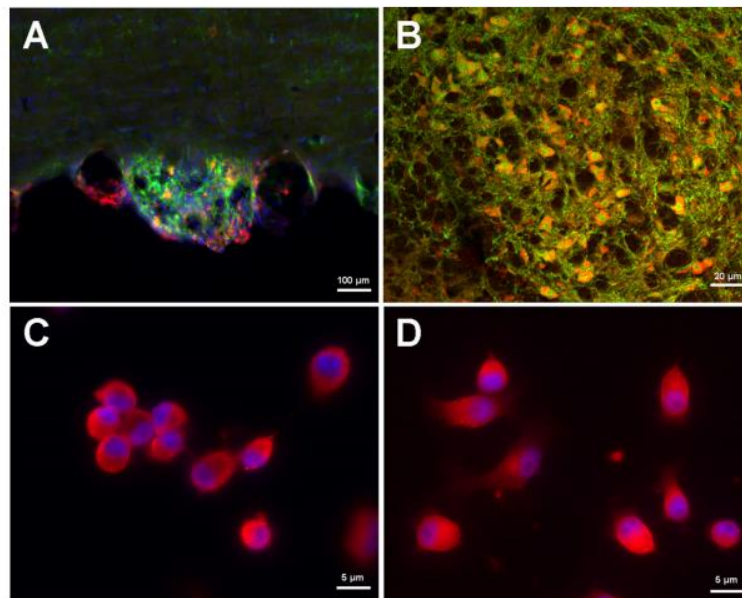


FIGURA 7 Marcação para Enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) endógena e receptor Mas em cérebro de rato e culturas neuronais.

Órgão subfornical (A) e medula ventrolateral rostral (B) marcação vermelho para ACE2 e marcador neuronal em verde (NeuN). Em amarelo há indicação da presença de ACE2 em células neuronais Neuro2A (neuroblastoma de camundongo). Marcação para ACE2 endógena (C) e receptor Mas(D). (XU *et al.*, 2011)

A ECA2 é uma glicoproteína de 120kDa, expressa como uma proteína transmembrana, mas também existe em forma solúvel, forma truncada, sem os domínios transmembrana e citosólicos, mas com sua atividade conservada (TIPNIS *et al.*, 2000). A sequência da proteína consiste de 805 aminoácidos. Funcionalmente, ACE2 atua como uma carboxipeptidase que cliva o resíduo leucil carboxi-terminal da ANG I, produzindo então Ang-(1-9). Originalmente, estudos com imunohistoquímica mostraram a proteína ECA2 predominantemente no endotélio de vários vasos no coração e rim e no epitélio do túbulo renal (Donoghue M *et al.*, 2000). Além disso, a expressão de mRNA de ECA2 foi encontrado em diversos

outros tecidos como cólon de intestino delgado, ovário, testículo, próstata, coração, fígado, músculo esquelético, com um alto nível de expressão no pulmão e rins (TIPNIS, 2000). Agora é evidente que a maioria dos tecidos expressam essa carboxipeptidase. No cérebro, ECA2 está amplamente distribuída no citoplasma do corpo de células neuronais, mas não em células gliais (DOOBAY, 2007; KAR *et al.*, 2010). *In vitro*, outros grupos identificaram a presença de ECA2 em células gliais (GALLAGHER *et al.*, 2006) demonstrando que a ECA2 pode ser regulada por peptídeos de angiotensina. Gallagher *et al.* sugerem que ANG II ativa receptores AT1 em astrócitos para reduzir expressão de mRNA para ECA2 e os níveis dessa proteína. A atividade reduzida de ECA2 poderia diminuir a conversão de ANG II em Ang-(1-7) e favorecer as respostas neurais mediadas por ANG II. Em contrapartida, a ativação de receptores AT2 por ANG-(1-7) bloqueia a redução da expressão de ECA2 mediada por Ang II, dessa forma existe um balanço entre Ang II e Ang-(1-7) no cérebro (GALLAGHER, 2006).

1.9. Receptor Mas

Em 2003, Santos *et al.* identificaram a ANG-(1-7) como ligante para o receptor Mas, estabelecendo o eixo ACE2/ANG-(1-7)/Mas como um novo braço do sistema renina angiotensina. (SANTOS, ROBSON A S, 2003). A expressão do receptor Mas em camundongos foi descrita em diversos órgãos e sistemas como coração, rins, pulmão, fígado, baço, língua e músculo esquelético (METZGER, 1995). A expressão do receptor Mas também foi observada em células endoteliais do cérebro de ratos (KUMAR *et al.*, 1996). Inicialmente, acreditava-se que a expressão de mRNA para o receptor Mas era restrita ao hipocampo, córtex e bulbo olfatório (YOUNG *et al.*, 1988), no entanto, com o desenvolvimento de anticorpos específicos, essas observações se estenderam para outras estruturas cerebrais como áreas relacionadas ao sistema cardiovascular, da medula do prosencéfalo, como o NTS, RVLM, CVLM, oliva inferior, porções parvo e magnocelular do PVN, núcleo supraoptico e área pré-optica lateral, mostrada também com sítios de ação da ANG-(1-7) no cérebro (BECKER *et al.*, 2007).

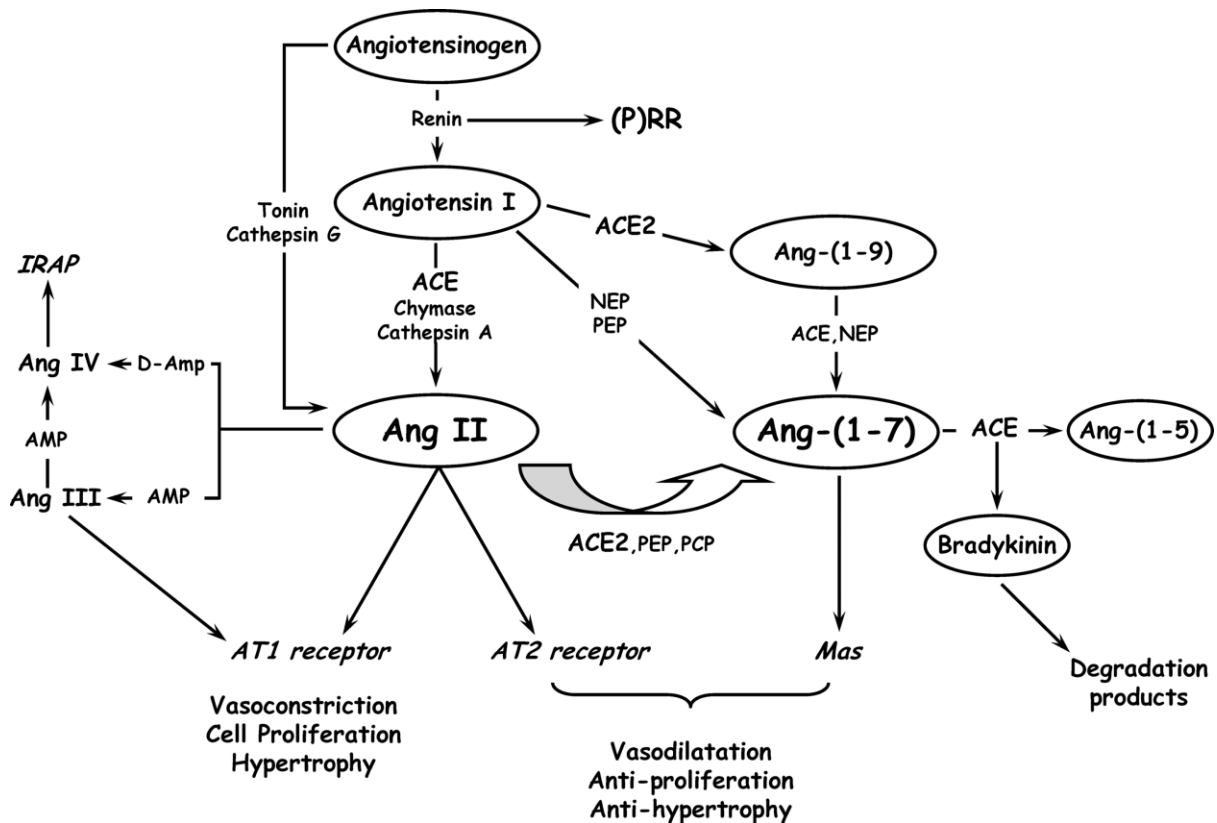


FIGURA 8 Visão simplificada do Sistema Renina –Angiotensina.

Abreviações: PRR, receptor (Pro) renina; Ang, Angiotensina; ACE, enzima convertora de angiotensina; ACE2, enzima convertora de angiotensina 2; NEP, neutroalendopeptidase; PEP, poliendo peptidase; AT1, receptor para angiotensina tipo I; AT2, receptor para angiotensina tipo 2; Mas, receptor Mas para Angiotensina; D-Amp, aminopeptidasedipeptidyl; PCP, proil-carboxipeptidase; (SANTOS, ROBSON A. S. *et al.*, 2008)

As vias de sinalização intracelular do eixo ACE2/ANG-(1-7)/Mas no SNC envolve moléculas de sinalização intrínsecas que induzem ações vasoprotetoras e contrabalança o eixo ACE/ANG II/AT1. A ANG II liga-se ao seu receptor AT1 e conseqüentemente há ativação da hidrólise do fosfoinositol mediada por Gq, o que leva ao aumento nos níveis de Ca^{+2} intracelular, precedido da ativação de proteína kinase C (PKC) e proteína quinase II dependente de cálcio calmodulina (CaMKII). Através dessa cascata de sinalização ocorre a inibição de correntes de K^+ e ativação de correntes de Ca^{2+} . Como consequência, essas mudanças levam ao aumento no disparo neuronal, que pode levar ao aumento na descarga simpática. Além desses efeitos intracelulares, a PKC também pode ativar a NAD(P)H oxidase, levando então a formação de espécies reativas de oxigênio, que estão envolvidas no desenvolvimento e manutenção de hipertensão (ZIMMERMAN *et al.*, 2004). Em paralelo, a fosfolipase C ativa a via de sinalização Ras/Raf/MAPK, responsável pela fosforilação dos fatores de transcrição c-jun e c-fos (DIJK *et al.*, 2004), o que

promove aumento da expressão de genes envolvidos com a síntese e transporte de noradrenalina em neurônios.

O NO é a molécula mais bem estudada no sistema ECA2/Ang-(1-7)/Mas, pois no endotélio, ele é produzido a partir da ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas. O NO é um gás difusível e sua presença no cérebro pode ter origem em diferentes tipos celulares, incluindo neurônios, endotélio, células musculares lisas, astrócitos e glia. A liberação do NO é dependente de receptor Mas (FENG *et al.*, 2010; GIRONACCI, 2000). A Ang-(1-7) ativa a via de sinalização PI3 kinase/Akt/proteinkinase B e leva a fosforilação duradoura da Ser¹¹⁷⁷ da NO sintase endotelial (SAMPAIO, 2007). In vivo, ANG-(1-7) estimula a liberação de NO e leva a superexpressão de eNOS em tecidos isquemiados, após isquemia e reperfusão focal em ratos (ZHANG, 2008). O NO pode ser neuroprotetor ou neurotóxico, depende da isoforma envolvida. O NO produzido pela eNOS reduz apoptose e confere proteção contra isquemia, enquanto as concentrações patológicas de NO produzidas pelas isoformas iNOS e nNOS induz apoptose e são neurotóxicas (JIANG MH *et al.*, 2002).

1.10. Sistema Renina Angiotensina e AVC

Em relação às células, o receptor Mas foi identificado predominantemente em neurônios (BECKER, 2007). 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 6 a 48 horas após isquemia focal. Além disso, também ocorre aumento na expressão do receptor Mas (LU, J. *et al.*, 2013), mostrando que os níveis de Ang-(1-7), ACE2 e expressão de receptor Mas estão aumentados após insulto isquêmico agudo em cérebro de ratos.

O eixo ACE2-Ang-(1-7)-Mas tem muitas características que nos levam a acreditar em seu potencial como um alvo para induzir neuroproteção em casos de AVC de forma eficiente.

Durante o AVC, o eixo ACE2-Ang-(1-7)-Mas sofre alterações dinâmicas, que podem permitir tratamentos alvo que atuam sinergicamente com mecanismos endógenos. Além disso, os efeitos são robustos: neuroproteção (XU, 2011) tem sido observada em vários modelos de AVC isquêmico (BENNION *et al.*, 2015; ZHENG,

J., 2014) e hemorrágico (SHIMADA *et al.*, 2015). E por último, uma hipótese bem aceita é a de que drogas com múltiplos efeitos terapêuticos, como os do eixo Ang-(1-7)-Mas, em oposição a um único mecanismo de ação, parecem ser mais confiáveis, pois podem atuar exercendo seus efeitos benéficos em mais de uma via de sinalização. Por todas essas razões, tem sido recentemente sugerido que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas no processo de AVC representa um candidato especial para terapia.

De forma importante para o AVC, as células do SNC expressam todos os componentes do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas (REGENHARDT *et al.*, 2013). Nos últimos anos, os níveis de expressão dos componentes desse eixo protetor e suas alterações após o AVC tem sido estudado. A expressão do receptor AT₁ está diminuída no córtex cerebral após a oclusão da artéria cerebral media (MCAO), e a expressão de ATR2 está aumentada após MCAO em regiões de córtex ventral e hipotálamo (KAGIYAMA *et al.*, 2003).

Mais pesquisa nessa área é necessária para entender melhor e identificar as formas pelas quais o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas pode ser alvo da ação sinérgica entre alterações endógenas nos componentes desse sistema e possível administração exógena do peptídeo.

Já foi demonstrado que a administração central de Ang-(1-7) durante AVC isquêmico atenua o aumento dos níveis de marcadores pro-inflamatórios no córtex cerebral (REGENHARDT, 2013) e que a ativação do eixo Ang-(1-7)/Mas também pode diminuir o estresse oxidativo, através da diminuição da expressão de duas isoformas da NADPH oxidase, Nox2 e Nox4 induzida por OGD (ZHENG, J. L. *et al.*, 2014) e então limitar a morte celular neuronal (Figura 9).

Em um modelo animal de isquemia cerebral permanente, a ativação de Mas através da administração de Ang-(1-7) exerceu alterações similares, diminuindo o estresse oxidativo e suprimindo a atividade de *NF-κB* e diminuiu também citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e COX-2 (JIANG *et al.*, 2012).

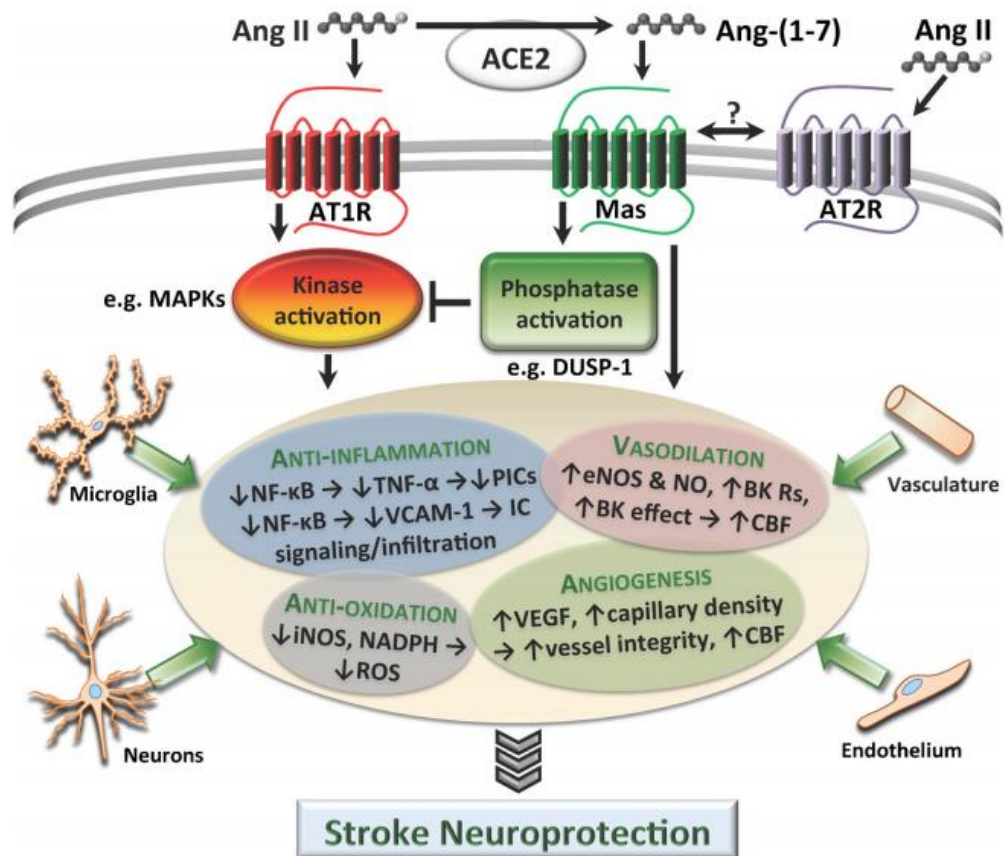


FIGURA 9 Os efeitos neuroprotetores que resultam da ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7).

Ativação do receptor Mas leva a defosforilação de elementos essenciais induzidos pela cascata AngII-ATR1, inibindo então efeitos deletérios. Os efeitos benéficos da ativação de Mas que podem ser induzido independente de AngII-ATR1, com contribuição potencial da sinalização em neurônios, microglia, células endoteliais e vasculares. Ang II, Angiotensina II; Ang -(1-7), Angiotensina (1-7); AT1R, receptor para Angiotensina tipo 1; AT2R, receptor para Angiotensina tipo 2; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; DUSP-1, *dual specificity phosphatase 1*; NF-κB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TNF-α, Fator de necrose tumoral; PIC, citocina proinflamatória; VCAM-1, proteína de adesão celular vascular 1; IC, célula inflamatória; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; NO, óxido nítrico; BKr, receptor para bradicinina; CBF, fluxo sanguíneo cerebral; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase; ROS, espécies reativas de oxigênio; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial. (BENNION, 2015)

2. OBJETIVO

2.1. 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-OGD).

2.2. 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.
- ✓ Analisar a viabilidade celular em fatias hipocâmpais após protocolo de privação de oxigênio e glicose (isquemia *in vitro*) seguida de reperfusão, em fatias de grupos teste e controle com Ang-(1-7) e A-779.
- ✓ Quantificar a quantidade total da subunidade GluR1 do receptor AMPA 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)
- ✓ Quantificar a quantidade total da subunidade GluR2 do receptor AMPA 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)
- ✓ Quantificar a quantidade da subunidade GluR1 do receptor AMPA na membrana e na fração citoplasmática 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)
- ✓ Quantificar a quantidade da subunidade GluR2 do receptor AMPA na membrana e na fração citoplasmática 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)
- ✓ Analisar a viabilidade celular em fatias hipocâmpais estimuladas com AMPA em fatias de grupos teste e controle com Ang-(1-7)

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. 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 178/2012.

3.2. SOLUÇÕES

Tabela 2: Lista de soluções utilizadas nos experimentos

Nome	Componentes (mM)
ACSF (Fluido Cérebro-espinhal artificial sem glicose)	H ₂ O Cloreto de Sódio (NaCl) (127) Cloreto de Potássio (KCl) (2,0) Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) (2,0) Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (2,0) Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃) (26,0) Fosfato ácido de potássio (KH ₂ PO ₄) (1,2) HEPES (13,0) pH=7,4 ajustado com HCl 1M
ACSF (Fluido Cérebro-espinhal artificial com glicose)	Glicose (10) pH=7,4 ajustado com HCl 1M
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
Tampão de RIPA	H ₂ O Tris-Base (50) NaCl (150)

	EDTA (100) NP40 - <i>nonyl phenoxy polyethoxy ethanol</i> -10%
Solução NADP ⁺	H ₂ O _d NADP ⁺ (400)
Glutamato Desidrogenase (GDH)	50 UI
Solução Padrão de Glutamato	H ₂ O _d L-Glutamic acid (1)
Gel eletroforese	Acrilamida Mix 30% Acrilamida 29% (p/v) Bis-acrilamida 1% (p/v) H ₂ O _d TRIS 1,5M pH= 8,8 SDS 10% (p/v) APS 10% (p/v) TEMED
Tampão de Amostra 5x	Solução TRIS-HCl 1M pH= 6,8 SDS (4) Glicerol 15,38% (v/v) B-mercaptoetanol 2,56% (v/v) Bromofenol Blue (0,007) H ₂ O _d
Tampão de Corrida 10x	Solução TRIS-HCl 0,25M pH= 8,3 Glicina (1910) SDS 1% (p/v) H ₂ O _d
Tampão de Transferência 10x	TRIS (120) Glicina (950) Metanol 20% (acrescentado apenas na solução final 1x) (v/v) H ₂ O _d
Solução TBS 10x	Tris-Base (190) NaCl (490) H ₂ O _d pH=7,5 ajustado com HCl 1N
Solução TBS-T	TBS 1x Tween 20 10% (v/v)
Solução de Bloqueio	BSA 5% (p/v) TBST 1x
Solução anticorpo primário	Anticorpo

	BSA 3% (p/v) TBST 1x
Glicina	H ₂ Od Glicina (100)
Paraformaldeído 4% Buffer 0,1M	H ₂ Od NaOH (100) Tampão fosfato (200) pH=7,4 ajustado com HCl 1M
Tampão fosfato (PB - 0,2M)	H ₂ Od Na ₂ HPO ₄ (400) NaH ₂ PO ₄ (200) pH=7,4 ajustado com HCl 1M

3.3. 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 invertida sobre o gelo, com papel de filtro umedecido com solução de ACSF gelado (4°C) e aerado, para a dissecação dos hipocampos. Em seguida, os hipocampos foram fatiados numa espessura de 400 µm usando-se fatiador de tecidos do tipo “chopper” (TissueChopper / Mcllwain™ Brinkmann Instruments, England). As três primeiras fatias do hipocampo de cada extremidade do tecido foram descartadas e as demais 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, esse grupo foi pré-incubado com A779 20 µM por 10 minutos e posteriormente foi adicionada Ang-(1-7) 20 µM e a diluição final foi Ang-(1-7) 10µM + A-779 10µM. Com o intuito de avaliar o efeito isolado de A-779, um 4º grupo recebeu A-779 10µM, diluído em ACSF. A779 é um antagonista seletivo do receptor Mas para Ang-(1-7). O A779 apresenta uma alta afinidade pelo receptor Mas (IC₅₀ = 0.3 nM). É ativo *in vivo* e *in vitro*. 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*.

3.4. PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (INSULTO ISQUEMICO 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 40 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 60 minutos. 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.

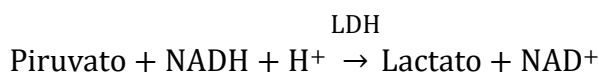
3.5. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À AGONISTA DE RECEPTOR GLUTAMATÉRGICO AMPA

Após a dissecação do hipocampo, as fatias de 300µM foram incubadas em meio contendo ACSF com glicose (10mM) e oxigênio para recuperação por 60 minutos. O subgrupo *estimulado* com AMPA foi incubado com o agonista AMPA (Sigma, Cat. No. A6816) (100µM) por 40 minutos. 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 estímulo com AMPA. Posteriormente ambos os grupos tiveram os meios trocados e foram mantidos em solução ACSF aerado com uma mistura carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂ com glicose (10mM) por 1 hora e recolhidos rapidamente para posteriores experimentos.

3.6. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

3.6.1. LACTATO DESIDROGENASE

O ensaio de lactato desidrogenase é uma forma de medir a integridade da membrana celular em função da quantidade de LDH liberado para o meio. A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica que faz parte da via anaeróbia durante a última etapa da via glicolítica. Essa etapa consiste em uma reação de oxirredução catalisada pela referida enzima (Papoti, Lemedede Almeida et al. 2008). Em situações de perda da integridade da membrana ou lise celular, a LDH é extravasada para o meio extracelular, apresentando máxima atividade no período de 1 hora após isquemia-reperfusão tecidual, e estabilizando nos períodos subsequentes (FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2005). A atividade da LDH, liberada no meio de incubação, foi determinada utilizando um kit comercial para LDH (Bioclin, Brasil), a fim de verificar o dano celular (lise). A Desidrogenase Láctica (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 absortividade a 340 nm.



O *kit* número 1 (Substrato Tamponado) contém: Tampão Tris (200mmol/L), Piruvato (6mmol/L), estabilizante e conservante e o *kit* Número 2 (Coenzima) Contém: Tampão (20mmol/L) NADH (5,0 mmol/L) e conservante. Para preparo do reagente de trabalho foi misturado nove partes do Reagente Nº 1, 180µl, com uma parte do Reagente Nº 2, 20 µl, e utilizamos 15 µl de amostra. Durante a leitura é condição indispensável o uso de cubeta termostaticada a 37°C, caminho óptico de 1cm e leitura em 340 nm. A nossa leitura foi feita em placa 96 poços e a leitura foi realizada no equipamento Synergy 2 (BioTek® Instruments, Inc.). A concentração catalítica da LDH foi determinada a partir da velocidade de decomposição do NADH, medida pela queda da absortividade a 340 nm. A dosagem foi realizada num período máximo de 3h após a coleta do meio de incubação. A normalização foi realizada através da dosagem de proteínas totais das amostras das fatias de hipocampo homogeneizadas previamente, como citado anteriormente (BRADFORD, 1976)

3.6.2. ETÍDIO-HOMODÍMERO

Para a quantificação da morte celular foi utilizado o marcador *Ethidium Homodimer* (EthD-1, 2mM) (Live/Dead – Viability/Cytotoxicity Kit – Life Technologies, 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 µl 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 1ml 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 o número de células marcadas por região selecionada. Quanto maior o número de células marcadas, maior o número de células mortas (LEITE *et al.*, 2012; MONETTE *et al.*, 1998; MOURÃO *et al.*, 2014)

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTAMATO

A mensuração do glutamato acumulado no sobrenadante das fatias foi determinada através de uma reação enzimática do 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 340nm emite uma fluorescência que pode ser detectada e quantificada em comprimento de onda de 440nm em um espectrofluorímetro de placa (Synergy®). O experimento foi realizado em triplicata e o *background* fluorescência foi determinado e subtraído dos valores encontrados, através da leitura do NADP^+ e do GDH junto ao KRH. Para a quantificação final utilizou-se um padrão interno de glutamato (5 nmol/ μl) como referência, acrescentado à solução ao final da reação (5 μl). 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). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.8. QUANTIFICAÇÃO DA QUANTIDADE DE GLUR1 E GLUR2

Volumes de amostra contendo 50 μg de proteína, determinadas pelo método de Bradford (1976), e um marcador padrão de pesos moleculares de proteína, foram descongeladas e inicialmente aquecidas por 4 minutos, a 95°C. Ao final do período de aquecimento, as amostras e o marcador foram rapidamente transferidos para um recipiente com gelo por 10 minutos.

As amostras foram misturadas a um tampão de amostra 5x (volume de 25% do volume da amostra), centrifugadas (*spin* de 16 seg., 4°C) e aplicadas em um gel de poliacrilamida 4-7,5%. O marcador padrão de pesos moleculares de proteína foi aplicado (5 μl) na primeira canaleta à esquerda do gel.

O processo de eletroforese ocorreu a uma voltagem de 100V fixa, mantida até o término da corrida por todo o comprimento do gel. Ao final do processo, o gel foi lavado em tampão de transferência e posicionado entre papéis de filtro e uma membrana de PVDF (membrana imobilon-psq em PVDF, 0.22 micra de poro, MILLIPORE), previamente preparada (mergulhada em metanol, durante 5 minutos sob agitação).

A transferência foi realizada a uma voltagem de 100v fixa, por um período de 90 minutos. Ao final a membrana foi retirada, mergulhada em solução de Ponceau para confirmação da transferência por 5 minutos, seguindo período de lavagem por 5 minutos em solução de TBS1x. Ao final da lavagem a membrana foi mergulhada em solução de bloqueio por 1 hora, sob agitação.

Ao final do período de bloqueio a membrana foi cortada e as regiões de interesse como os referidos pesos moleculares foram isolados. A partir desse ponto foram lavadas rapidamente em solução de TBS-T 1x.

A primeira membrana foi então incubada "overnight" a 4°C, sob agitação, com anticorpo primário anti-GluR1 (151 kDa; *Anti-Glutamate receptor 1 Polyclonal Antibody*, Millipore; rabbit) ou anticorpo primário anti-GluR2 (*Anti-Ionotropic Glutamate receptor 2 antibody*, abcam) diluído em TBS-T1x e BSA (5%) (1:1000). Após incubação procedeu-se protocolo de lavagem, 3 vezes por 5 minutos cada lavagem. Após, seguiu-se a incubação por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-rabbit) diluído em TBS-T 1x e BSA (3%) (1:2.000). Após incubação a membrana foi lavada em solução de TBS-T1x, 2 vezes por 10 minutos cada lavagem e encaminhadas para revelação.

A segunda membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação, com anticorpo primário anti- β actina (42kDa;mouse), diluído em TBS-T e BSA (5%) (1:500). Após incubação procedeu-se protocolo de lavagem, 3 vezes por 10 minutos cada lavagem em TBS-T 1x, seguido de incubação por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-mouse), diluído em TBS-T1x e BSA(3%) (1:7000). Após incubação, a membrana foi lavada em solução de TBS-T, 2 vezes por 20 minutos cada lavagem e encaminhada para revelação. A detecção foi realizada pelo processo de quimiluminescência, utilizando kit luminol:peroxidase (relação 1:1)(Millipore). As proteínas foram detectadas por

quimiluminescência, utilizando o sistema de escaneamento Image Quant LAS-4000 (GE Healthcare).e as imagens adquiridas foram salvas no formato*.tif. As imagens foram processadas e quantificadas por densitometria óptica, através do software livre *ImageJ–Image Processing and analysis in Java* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Bandas não saturadas foram quantificadas por sistema de densitometria óptica.

3.9. ENSAIO DE BIOTINILAÇÃO

Para a biotinição da superfície celular, imediatamente após o processo de isquemia/reperfusão, as fatias foram então colocadas no gelo, lavadas uma vez em ACSF gelado, e as proteínas da superfície das células marcadas com 1,5 mg / ml de biotina (EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin), durante 1 hora sob agitação leve e constante.

As fatias foram lavadas com 100 mM de glicina em ACSF, com o objetivo de eliminar a biotina não ligada, e posteriormente incubadas com glicina em ACSF durante 30 minutos sobre o gelo sem agitação. As fatias foram mantidas no gelo, lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas com tampão de lise RIPA contendo inibidores de protease (1 mM de AEBSF, 10 ug / ml de leupeptina e 5 ug / ml de aprotinina).

Os lisados foram agitados sobre uma plataforma oscilante durante 1h a uma temperatura de 4°C sendo posteriormente centrifugados a 15000 rpm durante 15 minutos à uma temperatura de 4°C para sedimentar o material insolúvel.

O sobrenadante clarificado contendo 500 µg de proteína foi incubado com 100 µl de esferas de afinidade neutravidina (Pierce™ NeutrAvidin™ Agarose) durante 1h, em rotação a uma temperatura de 4°C para imunoprecipitar proteínas marcadas com biotina.

Realizou-se a lavagem por duas vezes com PBS1x, e as proteínas foram extraídas em tampão de amostra. As proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e imunizadas para identificar as proteínas GluR1 e GluR2, que foram biotiniladas, usando um anticorpo primário (1:1500_e um anti-coelho secundário conjugado com peroxidase (diluição 1:5.000).

A quantidade total de GluR1 e GluR2 foi determinada utilizando-se 100 ug de proteína obtida a partir do lisado celular total. As proteínas foram detectadas por quimiluminescência, utilizando o sistema de escaneamento Image Quant LAS-4000 (GE Healthcare).

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram obtidos para o número de experimentos independentes, como indicados nas legendas das figuras. O programa GraphPad PRISM (versão 6 GraphPad Software Inc.) foi utilizado para as análises estatísticas, que foi determinada pelo método two-way ANOVA seguido por post hoc *Bonferroni* e os mesmos foram considerados estatisticamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS:

4.1. Ang-(1-7) aumenta a viabilidade celular em fatias de hipocampo de camundongos submetidas à isquemia *in vitro*

A Ang-(1-7) tem sido descrita como um agente neuroprotetor (REGENHARDT *et al.*, 2014; WANG, L. *et al.*, 2014; ZHENG, J., 2014). Para determinar qual a melhor concentração de Ang-(1-7), necessária para diminuir a morte celular em fatias de hipocampo submetidas à isquemia *in vitro*, foi feita uma curva com diferentes concentrações de Ang-(1-7), utilizamos as concentrações de 100nM, 500nM, 1µM, 10µM e 100µM.

Verificamos que o protocolo de isquemia/reperfusão aumentou a liberação de LDH (759 ± 113) quando comparado ao grupo controle (173 ± 32). No entanto, a administração da concentração de 10 µM de Ang-(1-7) no grupo isquemia (211 ± 19) reduziu os níveis de LDH para níveis próximos aos do controle (173 ± 32).

Observou-se que há um efeito significativo do protocolo de isquemia *in vitro* ($F[1, 37] = 60,04, p < 0,0001$) e também há um efeito significativo do tratamento com Ang-(1-7) sobre liberação de LDH ($F [5, 37] = 8,505, p < 0,0001$). Verificamos então que existe uma interação significativa entre o protocolo de isquemia e o tratamento com Ang-(1-7) ($F (5, 37) = 8,888 p < 0,0001$). (Figura 10)

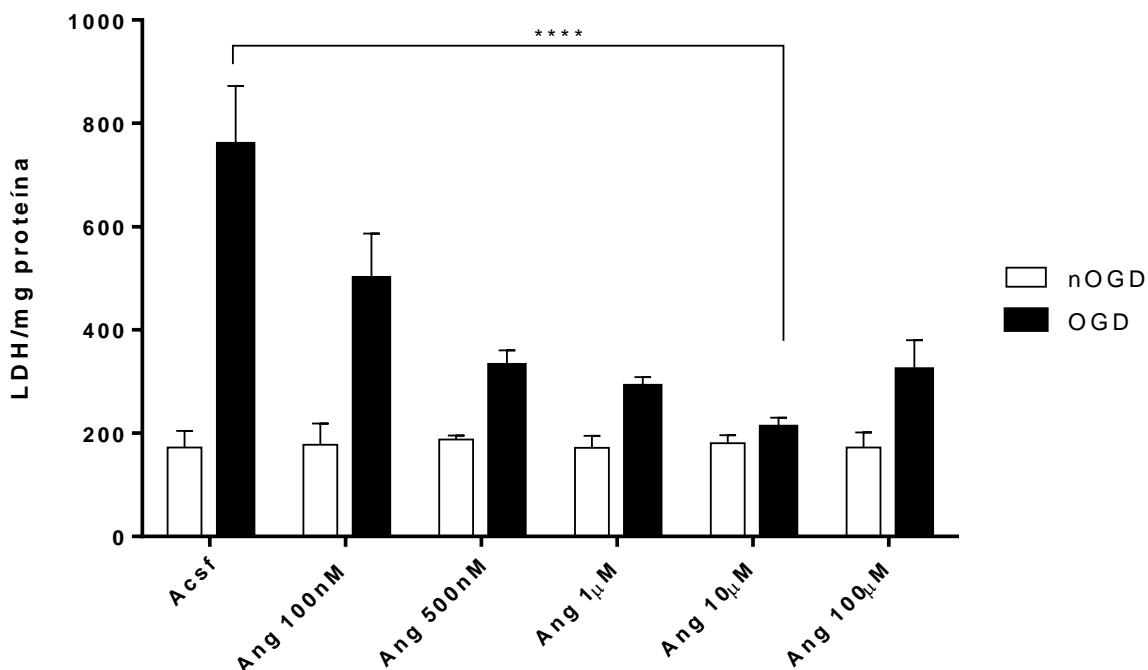


FIGURA 10 Efeito da Ang-(1-7) sobre a viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas à Isquemia *in vitro*.

Avaliação dos níveis da enzima lactato desidrogenase (LDH) acumulada no meio de incubação em fatias de hipocampo de camundongos, após protocolo de isquemia *in vitro* (POG 40min) reperusão (60minutos). Os grupos controle foram mantidos em ACSF com Glicose 10mM, 95% O₂ e 5% CO₂. n= 6. Colunas representam média ± E.P.M (erro padrão da média). Two-way ANOVA, post-hoc *Bonferroni*. Comparação intragrupos ***p<0,001.

4.2. Ang-(1-7) aumenta a viabilidade celular em fatias de hipocampo de camundongos submetidas à isquemia *in vitro*

Nossos resultados mostraram que após o processo de isquemia *in vitro* existe um aumento nos níveis da enzima LDH no meio de incubação do grupo isquemia (740 ± 87), quando comparado ao grupo controle nOGD (437 ± 105). Esse aumento da enzima LDH acumulada pode ser prevenido quando a Ang-(1-7) é administrada durante o período de isquemia *in vitro* (299 ± 50) (Figura 11).

Para verificar se o efeito protetor da Ang-(1-7) era dependente da ativação do receptor Mas, utilizamos o inibidor do receptor Mas, A779. Na presença do A779 os níveis da enzima LDH após o insulto isquêmico (648 ± 106) retornam para níveis próximos ao do grupo isquemia (740 ± 87) (Figura 11)

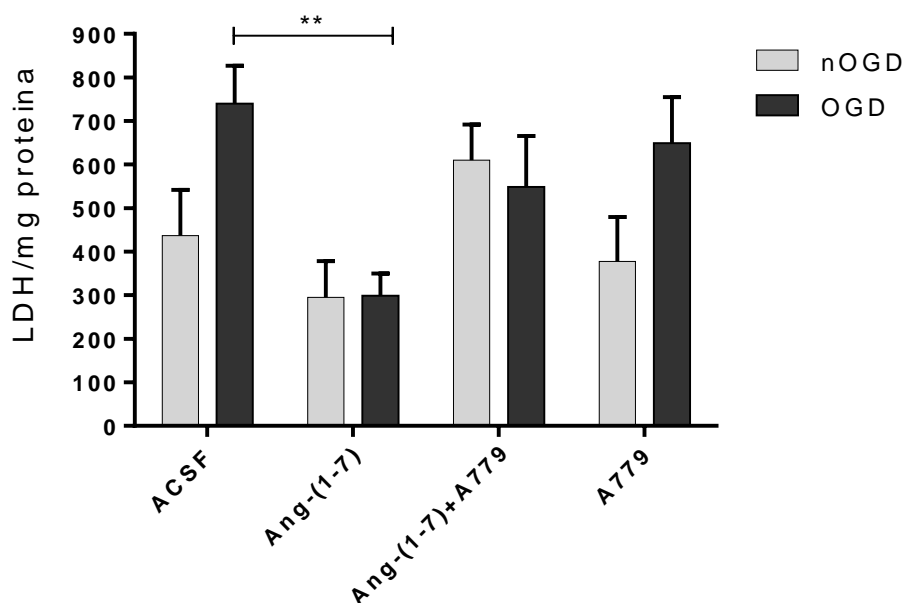


FIGURA 11 Efeito da Ang-(1-7) sobre a viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas à Isquemia *in vitro*.

Avaliação dos níveis da enzima lactato desidrogenase (LDH) acumulada no meio de incubação em fatias de hipocampo de camundongos, após protocolo de isquemia *in vitro* (POG 40min). Os grupos controle foram mantidos em ACSF com Glicose 10mM, 95% O₂ e 5% CO₂. n= 6-10. Colunas representam média±E.P.M (erro padrão da média). Two-way ANOVA, post-hoc *Bonferroni*. Comparação intragrupos ***p<0,01

4.3. Ang-(1-7) aumenta a viabilidade celular em fatias de hipocampo de camundongos submetidas à isquemia *in vitro* após reperusão

Quando verificamos os níveis da enzima LDH após o período de reperusão observamos que há aumento da LDH acumulada no grupo que sofreu o processo de privação de oxigênio e glicose (724 ±91) quando comparado ao grupo controle (251 ± 40) (Figura 12). O aumento nos níveis da enzima LDH durante o processo de OGD (724 ±91) pode ser prevenido quando a Ang-(1-7) está presente durante o processo de OGD (338 ± 68). Verificamos que na presença do inibidor do MasR, A779, a Ang-(1-7) não é mais capaz de prevenir a morte celular induzida pelo insulto isquêmico, causando aumento da enzima LDH acumulada no meio de incubação (558 ± 48), que retorna para níveis próximos aos do grupo submetido à isquemia (724 ±91) (Figura 12)

Observou-se que há um efeito significativo do protocolo de isquemia *in vitro* ($F [1, 50] = 7,164, p < 0,05$) e também há um efeito significativo do tratamento com Ang-(1-7) sobre liberação de LDH ($F (3, 50) = 4,141, p < 0,05$). Além disso, verificamos uma interação significativa entre o protocolo de isquemia e o tratamento com Ang-(1-7) ($F [3, 50] = 4,010$) logo após o processo de reperfusão.

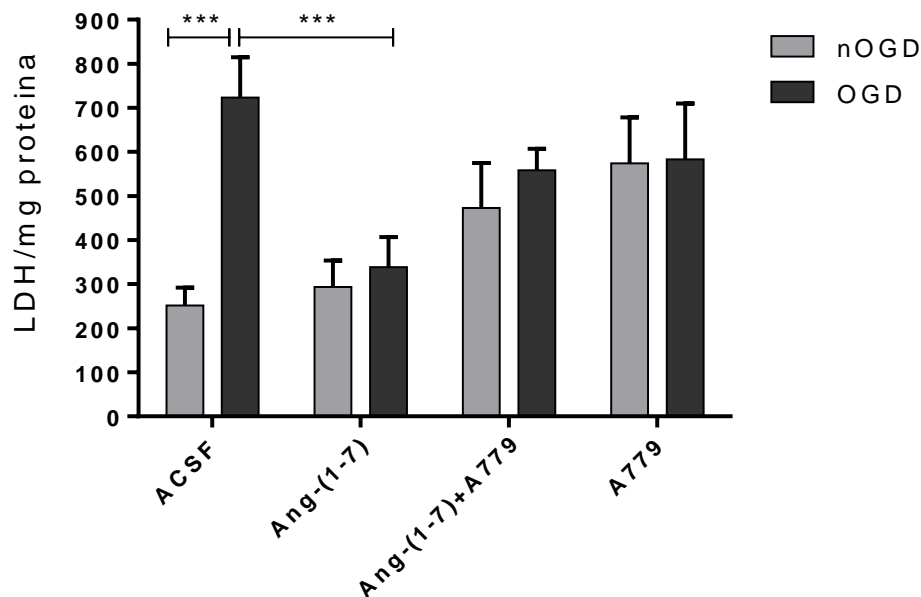


FIGURA 12 Efeito da Ang-(1-7) sob a viabilidade celular de fatias de hipocampo submetidas à Isquemia *in vitro*.

Avaliação dos níveis da enzima lactato desidrogenase (LDH) acumulada no meio de incubação em fatias de hipocampo de camundongos, após protocolo de isquemia *in vitro* (OGD 40min) e reperfusão (60 minutos). Os grupos controles foram mantidos em ACSF com Glicose 10mM, 95% O₂ e 5% CO₂. n= 6-10. Colunas representam média±E.P.M (erro padrão da média). Two-way ANOVA, post-hoc *Bonferroni*. Comparação intragrupos *** p<0,001. Comparação intergrupos *** p<0,001.

4.4. O tratamento com Ang-(1-7) durante a isquemia reduz a liberação de glutamato

Após mostrar que a Ang-(1-7) é um agente neuroprotetor, decidimos avaliar quais os mecanismos poderiam estar envolvidos com a neuroproteção. A análise da quantidade de glutamato liberado no meio de incubação mostrou que a isquemia induz um aumento na liberação de glutamato, ($2,70 \pm 0,47$ nmol/mg proteína) quando comparado ao grupo controle ($1,16 \pm 0,30$ nmol/mg proteína), como classicamente descrito na literatura (BRONGHOLI *et al.*, 2006). Entretanto, quando a Ang-(1-7)

está presente durante o processo de isquemia, este aumento na liberação de glutamato classicamente induzido pela isquemia é prevenido ($1,07 \pm 0,44$ nmol/mg proteína) e retorna para níveis muito próximos aos níveis do controle ($1,33 \pm 0,058$ nmol/mg proteína).

Observou-se que não há um efeito significativo do tratamento com Ang-(1-7) sobre liberação de glutamato ($F [1, 12] = 4,116$ $p > 0,5$), e também não um efeito significativo do protocolo de isquemia *in vitro* ($F [1, 12] = 3,160$, $p > 0,5$), no entanto há uma interação significativa entre estes dois fatores ($F [1, 12] = 6,199$, $p < 0,05$).

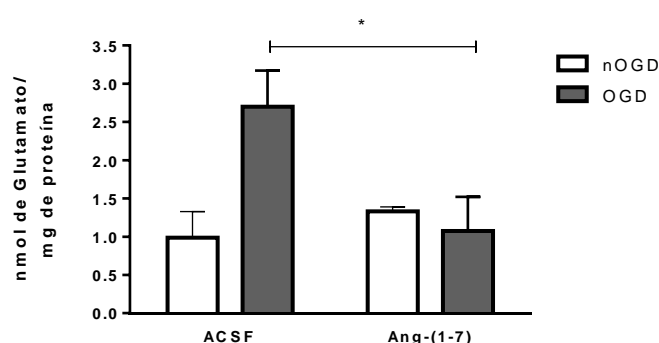


FIGURA 13 Efeito da Ang-(1-7) sobre a liberação de glutamato.

Análise de glutamato acumulado no meio de incubação, avaliado pela conversão do L-glutamato em α -cetoglutarato, na presença de NAD^+ e da enzima glutamato desidrogenase (GDH) no meio de incubação. Resultados expressos como média \pm EPM em fatias de hipocampo, após 40 minutos de privação de oxigênio e glicose e 1 hora de reperusão. 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. $n=4$. Two-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni. Comparação intragrupo, * $p < 0,05$

4.5. Ang-(1-7) modula a quantidade de GluR2 em fatias de hipocampo submetidas à OGD

A análise da quantidade da subunidade GluR2 revelou uma redução, estatisticamente significativa, dos níveis GluR2 no grupo isquemia ($0,76 \pm 0,078$) quando comparado ao grupo controle ($1,34 \pm 0,12$). No entanto, o tratamento com a Ang-(1-7) previne essa diminuição de quantidade da subunidade GluR2 ($1,12 \pm 0,016$). Além disso, o grupo controle tratado com Ang-(1-7) mostrou níveis de quantidade de GluR2 ($1,11 \pm 0,06$) semelhantes ao grupo controle ($1,34 \pm 0,12$). Observou-se que não há um efeito significativo do tratamento com Ang-(1-7) sobre a quantidade de GluR2 ($F [1, 18] = 0,5815$, $p > 0,05$), ao passo que existe um efeito

significativo do protocolo de isquemia *in vitro* ($F[1, 18]=14,15, p<0,01$) e uma interação significativa entre estes dois fatores ($F[1, 18] = 14,20, p<0,01$).



FIGURA 14 Quantidade de GluR2 em fatias de hipocampo cerebral após processo de isquemia/reperfusão.

(A) Resultados expressos como média \pm EPM da quantidade de GluR2 (densitometria óptica – GluR2/GADPH) em fatias de hipocampo, após 40 minutos de privação de oxigênio e glicose e 1 hora de reperfusão. (B) Western Blot representativo da quantidade total de GluR2 em fatias de hipocampo, após 40 minutos de privação de oxigênio e glicose e 1 hora de reperfusão. Os grupos controles foram mantidos em ACSF com glicose 10mM, e uma mistura de gases contendo 95% O₂ e 5% CO₂. Os resultados são expressos como média \pm EPM. $n=6$. Two-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni. Comparação intragrupos $*p<0,05$. Comparação intergrupos $***p<0,001$.

4.6. Ang-(1-7) não altera quantidade de GluR1

A análise da quantidade da subunidade GluR1 revelou que durante o insulto isquêmico não há diminuição significativa na quantidade total da subunidade GluR1 ($0,96\pm0,19$) quando comparada ao grupo controle ($1,01\pm0,058$). Além disso, o tratamento com Ang-(1-7) no grupo isquêmico ($1,44\pm0,102$) não é estatisticamente diferente do grupo controle na presença de Ang-(1-7) ($1,44\pm1,02$) (Figura 13).

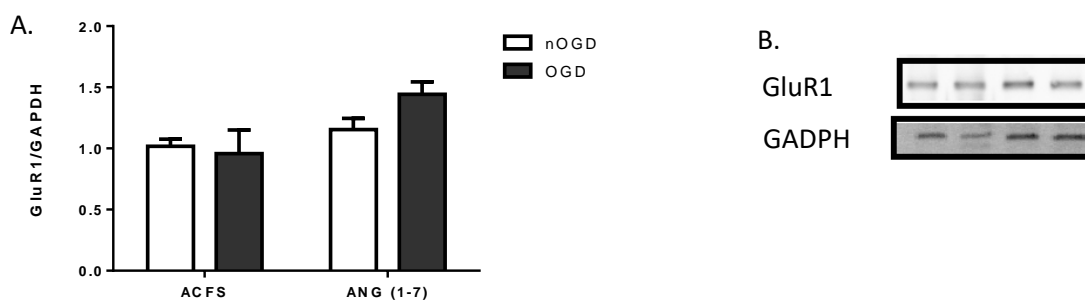


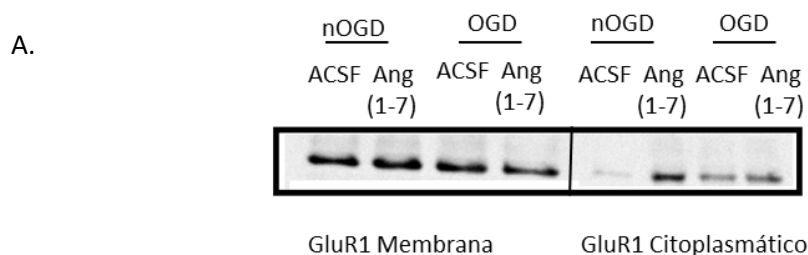
FIGURA 15 (A) **Quantidade de GluR1 em fatias de hipocampo cerebral após processo de isquemia/reperfusão.** Resultados expressos como média \pm EPM da quantidade de GluR1 (densitometria óptica – GluR1/GADPH) em fatias de hipocampo, após 40 minutos de privação de oxigênio e glicose e 1 hora de reperfusão. (B) Western Blot representativo da quantidade total de GluR1 em fatias de hipocampo, após 40 minutos de privação de oxigênio e glicose e 1 hora de reperfusão. Os grupos controles foram mantidos em ACSF com glicose 10mM, e uma mistura de gases contendo 95% O₂ e 5% CO₂. Os resultados são expressos como média \pm EPM. n=5. Two-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni

4.7. Ang-(1-7) altera quantidade citoplasmática de GluR1

A análise da quantidade da subunidade GluR1 revelou que durante o insulto isquêmico não há alteração significativa na quantidade de GluR1 na membrana plasmática do grupo submetido ao insulto isquêmico (1686 \pm 192) quando comparado ao controle (2017 \pm 229).

Observamos que houve um efeito significativo do protocolo de isquemia na quantidade de GluR1 na membrana (F [1, 14] = 8,872, p<0,01), no entanto, não observamos um efeito significativo da Ang-(1-7) sobre a quantidade de GluR1 na membrana plasmática (F [1, 14] = 2,292, p>0,05) e não há interação entre esses dois fatores (F [1, 14] = 0,7203, p>0,05).

Já em relação à quantidade de GluR1 citoplasmático, o insulto isquêmico aumenta quantidade citoplasmática de GluR1 (2496 \pm 152) quando comparado ao grupo controle (1386 \pm 96). Além disso, o tratamento com Ang-(1-7) aumenta a quantidade de GluR1 no grupo controle Ang-(1-7) (2176 \pm 281) quando comparado ao grupo controle sem Ang-(1-7) (1386 \pm 96) (Figura 14).



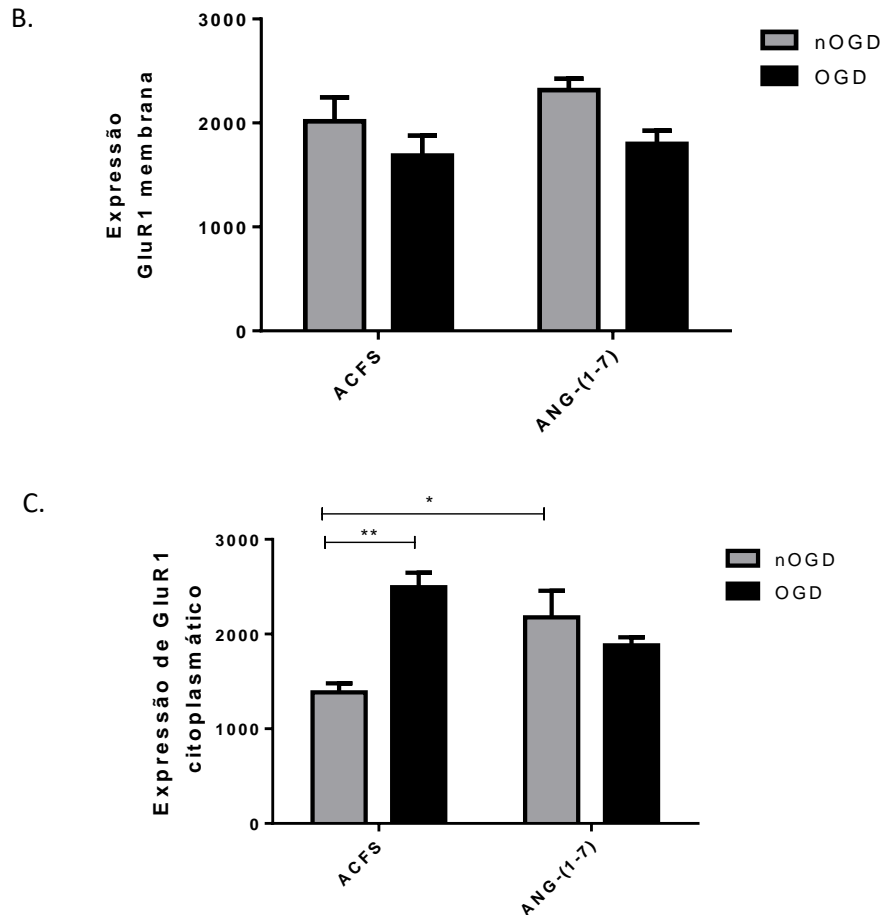


FIGURA 16 Quantidade de GluR1 na membrana e no citoplasma em fatias de hipocampo após processo de isquemia/reperfusão.

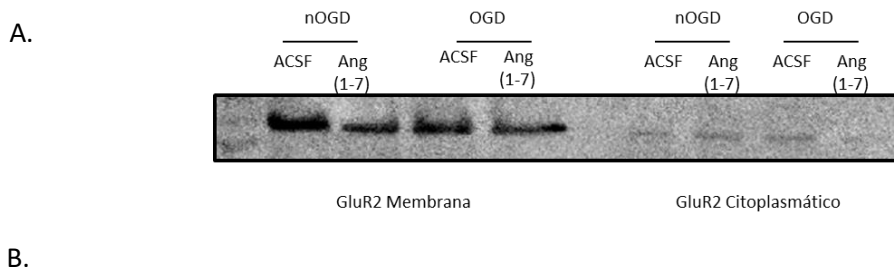
(A) Western Blot representativo de quatro experimentos independentes após biotilação de proteínas de superfície, (B) Resultados expressos como média \pm EPM da quantidade de GluR1 na membrana (densitometria óptica – GluR1) em fatias de hipocampo, após 40 minutos de privação de oxigênio e glicose e 1 hora de reperfusão (C) Resultados expressos como média \pm EPM da quantidade de GluR1 no citoplasma. Os grupos controles foram mantidos em ACSF com glicose 10mM, e uma mistura de gases contendo 95% O₂ e 5% CO₂. Os resultados são expressos como média \pm EPM. n=4. Two-way ANOVA, post-hoc de Bonferroni. Comparação intragrupos *p<0,05. Comparação intergrupos **p<0,01.

4.8. Ang-(1-7) altera quantidade membranar de GluR2 em fatias de hipocampo submetidas à OGD

Já foi descrito na literatura que a privação de oxigênio e glicose leva à diminuição da quantidade da subunidade GluR2 do receptor AMPA na membrana (BESKE, 2015)

Segundo nossos resultados, a análise da quantidade da subunidade GluR2 revelou que durante o insulto isquêmico há diminuição significativa na quantidade de GluR2 na membrana plasmática do grupo submetido ao insulto isquêmico (1147 ± 203) quando comparado ao controle (2336 ± 437), assim como descrito na literatura. Entretanto, nossos resultados são os primeiros a demonstrar que o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de prevenir a internalização da subunidade GluR2 induzida pelo insulto isquêmico (2648 ± 51) para níveis próximos ao controle tratado com Ang(1-7) (2515 ± 237) (Figura 15).

Apesar de descrito na literatura que o insulto isquêmico leva à diminuição da quantidade de GluR2 citoplasmático (BESKE, 2015), nós não observamos diferença significativa em relação à quantidade de GluR2 citoplasmático durante o insulto isquêmico ($F [1,12] = 0,9884, p = 0,33$)



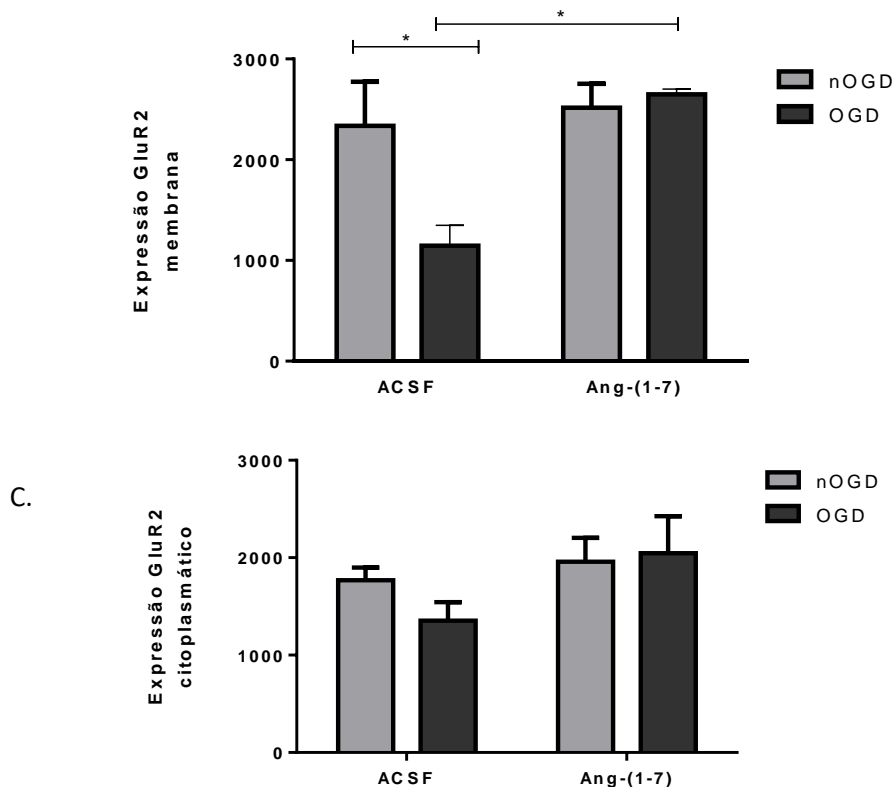


FIGURA 17 Quantidade de GluR2 na membrana e no citoplasma em fatias de hipocampo cerebral após processo de isquemia/reperfusão.

(A) Western Blot representativo de quatro experimentos independentes após biotilação de proteínas de superfície. (B) Resultados expressos como média \pm EPM da quantidade de GluR2 na membrana (densitometria óptica – GluR2) em fatias de hipocampo, após 40 minutos de privação de oxigênio e glicose e 1 hora de reperfusão. (C) Resultados expressos como média \pm EPM da quantidade de GluR2 no citoplasma. Os grupos controles foram mantidos em ACSF com glicose 10mM, e uma mistura de gases contendo 95% O₂ e 5% CO₂. Os resultados são expressos como média \pm EPM. n=4. Two-way ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni. Comparação intragrupos *p<0,05. Comparação intergrupos *p<0,05.

4.9. Ang-(1-7) previne morte celular estimulada por agonista AMPA

O estímulo com o agonista AMPA em cultura de fatias de hipocampo é tóxica na concentração de 100 μ M (KRISTENSEN, 2001). Verificamos que o tratamento de fatias de hipocampo com agonista AMPA a 100 μ M induziu aumento nos níveis da enzima LDH (1121 \pm 27) quando comparada ao grupo controle (188 \pm 46) (Figura 18). Esse aumento da LDH acumulada pode ser prevenido quando a Ang-(1-7) é administrada juntamente com o agonista AMPA (608 \pm 104). Observou-se que houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento com agonista AMPA (F [1, 8] = 108,6, p<0,001), além disso houve também um efeito do tratamento com Ang-(1-7)

($F[1,8] = 12,21$, $p < 0,05$) e uma interação entre esses parâmetros também foi verificada $F [1, 8] = 24,72$, $p < 0,001$).

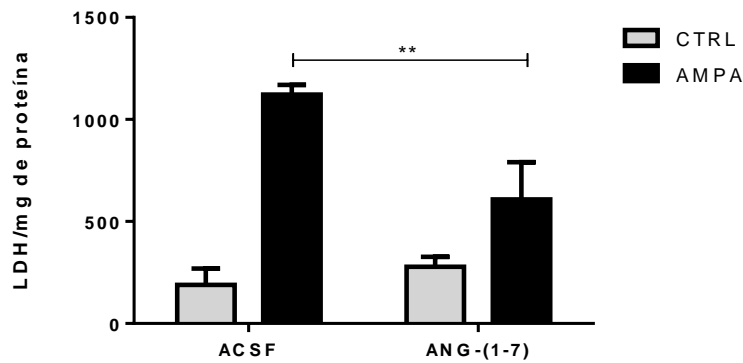


FIGURA 18 Efeito da Ang-(1-7) sob a viabilidade celular de fatias de hipocampo estimuladas com AMPA.

Avaliação dos níveis da enzima lactato desidrogenase (LDH) acumulada no meio de incubação em fatias de hipocampo de camundongos, após incubação com agonista AMPA 100 μ M (40min) ou agonista AMPA 100 μ M + Ang-(1-7) 10 μ M e recuperação (60 minutos). Os grupos foram mantidos em ACSF com Glicose 10mM, 95% O₂ e 5% CO₂. n= 3. Colunas representam média \pm E.P.M (erro padrão da média). Two-way ANOVA, post-hoc *Bonferroni*. Comparação intragrupos ** $p < 0,01$.

4.10. Ang-(1-7) reduz a morte celular induzida por AMPA em fatias de hipocampo

O estímulo com o agonista AMPA em cultura de fatias de hipocampo é tóxica na concentração de 100 μ M (KRISTENSEN, 2001). A análise da viabilidade celular realizada pelo ensaio de fluorescência (EthD-1), mostrou que o tratamento de fatias de hipocampo com agonista AMPA a 100 μ M elevou os níveis de morte (número de células marcadas) (310 \pm 27) quando comparado ao grupo controle (190 \pm 45). Observou-se que houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento com agonista AMPA ($F [1, 37] = 12,21$, $p < 0,001$), no entanto, não houve um efeito do tratamento com Ang-(1-7) ($F [1, 37] = 1,425$, $p > 0,05$).

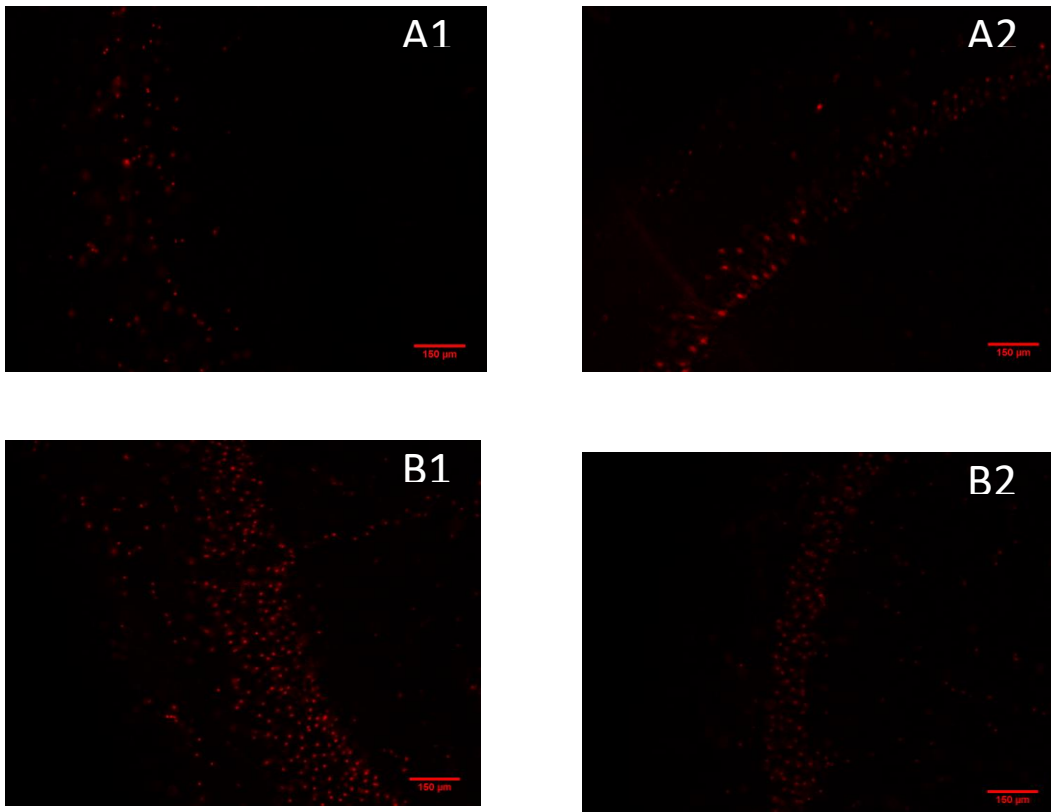
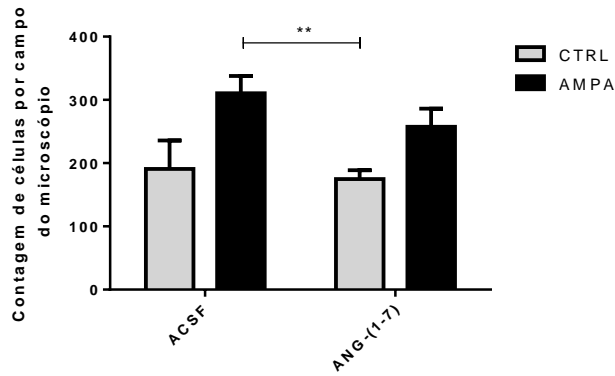


FIGURA 19 Viabilidade celular em fatias de hipocampo estimuladas com agonista AMPA. Análise da viabilidade celular através de método fluorescente, empregando o marcador de morte celular - EthD-1. As fatias foram analisadas após 40 minutos de estímulo com AMPA e 60 min de recuperação. Imagens representativas da marcação com Eth-D-1: **A1)** Controle. **A2)** Ang-(1-7) controle. **B1)** AMPA. **B2)** AMPA + Ang-(1-7). n=4 Os resultados foram expressos como média ± EPM da porcentagem de morte celular, que corresponde ao número de células marcadas positivamente para EthD-1. Two-way ANOVA, *post-hoc Bonferroni*. Comparação intergrupos **p<0,01.

5. DISCUSSÃO

A fisiopatologia do AVC é multifatorial e complexa, mas a hipertensão é o fator de risco principal para o desenvolvimento de AVC isquêmico e hemorrágico (IADECOLA *et al.*, 2008). Os esforços para desenvolver novas terapias para a

prevenção e tratamento de acidente vascular cerebral têm sido dificultados pela natureza multifatorial da doença, e por isso continua a ser uma das principais causas de morte e deficiências em longo prazo em todo o mundo (SMITH, 2011).

O sistema renina angiotensina desempenha funções fisiológicas clássicas como controle de pressão arterial (SANTOS, ROBSON A S, 2003) e ultimamente tem sido relatado seu papel em doenças cardiovasculares. O SRA no cérebro influencia funções relacionadas ao balanço hidromineral, pressão arterial, funções neurosecretoras e homeostase corporal (KARAMYAN *et al.*, 2007).

No SRA, a enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2) e o receptor Mas têm forçado uma reavaliação da cascata original desse sistema e levou ao surgimento de um novo braço de RAS: o eixo ECA2/Ang- (1-7)/Mas (SANTOS, ROBSON A *et al.*, 2013). Assim, o novo sistema é agora visto como um equilíbrio entre um eixo que induz vasoconstrição, crescimento e fibrose (ECA/ANG-II/AT1) e um eixo que é antifibrótico, induz vasodilatação e inibe crescimento (ECA2/Ang-(1-7)/Mas) (MACHADO-SILVA, 2016).

Como esse sistema é muito mais complexa do que o que foi originalmente pensado, diversos outros papéis tem sido descritos para esse sistema em diferentes órgãos (WILLIAMS, 2016), inclusive no cérebro. Quando administrada no NTS e núcleo motor dorsal do vago, a Ang-(1-7) é capaz de gerar efeitos depressores (CAMPAGNOLE-SANTOS, 1989). Atualmente, um número crescente de estudos tem demonstrado os efeitos neuroprotetores da Ang-(1-7) em acidente vascular cerebral do tipo hemorrágico e isquêmico (BENNION, 2015; REGENHARDT, 2013 (XU, 2011; ZHENG, J. L., 2014; ZHENG, J., 2014).

Nossos resultados mostraram que a Ang-(1-7), quando administrada durante o insulto isquêmico, previne a morte celular em fatias de hipocampo submetidas à isquemia *in vitro*, esse resultado foi visto após um insulto isquêmico de 40 minutos seguido por um período de reperfusão de 1 hora. O nosso primeiro experimento foi uma curva concentração resposta, para avaliar qual seria a melhor concentração de Ang-(1-7) capaz de promover neuroproteção. Essa curva mostra que a melhor concentração para diminuir morte celular é a de 10µM de Ang-(1-7), pois nesta concentração os níveis da enzima lactato desidrogenase caem para níveis próximos aos do controle. Apesar de baixas concentrações de Ang-(1-7), como 100nM e

500nM terem sido capazes de reduzir parcialmente a morte celular induzida pelo insulto isquêmico, essa redução não chegou à níveis tão próximos aos do controle quanto a concentração de 10 μ M. Com base na curva concentração dose-resposta nós utilizamos a concentração de 10 μ M para os experimentos posteriores.

Esse efeito neuroprotetor da Ang-(1-7), no entanto, é prevenido pela coadministração do antagonista do receptor Mas, A-779. Esses dados estão de acordo com a literatura, que demonstra que em modelos de isquemia in vivo, como a oclusão da artéria média cerebral induzida por endotelina (ET-1), a área de infarto é reduzida em aproximadamente 50% quando se faz infusão central de Ang-(1-7) e esse efeito pode ser prevenido pela administração do antagonista A779 (REGENHARDT, 2014). O nosso trabalho mostrou que o bloqueio do receptor Mas por 10 minutos, utilizando o A779 na concentração de 20 μ M, seguido pela administração de Ang-(1-7) também na concentração de 20 μ M - o que deixou ambos na concentração final de 10 μ M - foi suficiente para causar a aumento na liberação de LDH após a isquemia e após a reperfusão, abolindo completamente o efeito neuroprotetor mediado pela Ang-(1-7). Esse dado demonstra que o efeito da Ang-(1-7) é dependente da ativação do receptor Mas.

Além disso, foi observado que o bloqueio do receptor Mas no grupo controle foi capaz de induzir morte celular, demonstrando a importância fisiológica da Ang-(1-7) endógena. Esse resultado é muito interessante e está de acordo com dados publicados na literatura. Em 2016, ABWAINY *et al.* demonstraram que a Ang-(1-7) endógena e ativação do receptor Mas medeiam efeitos cardioprotetores em casos de isquemia e reperfusão. Em 2015, YANG J *et al* também demonstraram a importância da Ag-(1-7) endógena, mostrando que a Ang-(1-7) endógena desempenha um papel protetor contra placa aterosclerótica instável.

Sabe-se que um dos principais mecanismos relacionados à morte celular decorrente do insulto isquêmico é o excesso de liberação de glutamato para o meio extracelular (LAI, 2014). O primeiro *link* entre glutamato e dano isquêmico foi reportado em 1959, quando VAN HARREVELD descobriu que aplicações tópicas de glutamato eram capazes de induzir uma onda de hiperatividade e despolarização eletrofisiológica, propondo então que o glutamato poderia estar envolvido em alterações corticais seguidas de insulto isquêmico. Estudos subsequentes têm

demonstrado evidências consistentes de que a excitotoxicidade mediada pelo glutamato é o principal causador da morte neuronal. O primeiro passo que leva a excitotoxicidade durante um episódio agudo de isquemia é a rápida elevação nos níveis de glutamato na região cerebral acometida pelo insulto isquêmico (DAWSON *et al.*, 2000; GLOBUS *et al.*, 1988; MITANI *et al.*, 1990). Isso nos leva a acreditar que a inibição da liberação de glutamato durante a isquemia poderia levar a neuroproteção através da inibição de diversas cascatas de sinalização *downstream* que levariam a morte celular. Os mecanismos pelos quais o glutamato é liberado são multifatoriais e dependem da severidade do insulto isquêmico e dos modelos usados (LAI, 2014). Drogas que antagonizam a excitação neuronal mediada por glutamato também podem prevenir a neurotoxicidade associada. Nossos resultados mostram que a Ang-(1-7) é capaz de prevenir a liberação de glutamato induzida pelo insulto isquêmico.

Em contraste com o conceito de excitotoxicidade, que sugere que o cátion sódio é a principal molécula envolvida em neurotoxicidade, muitos outros processos citotóxicos em tecidos neurais e não neurais, como o coração, músculo e fígado, requerem o cátion bivalente Ca^{2+} . A extensão dessa hipótese do Ca^{2+} na excitotoxicidade corrobora com evidências experimentais demonstrando que o glutamato e outros aminoácidos excitatórios também aumentam o influxo de Ca^{2+} em neurônios (BERDICHEVSKY *et al.*, 1983).

O íon cálcio é uma das moléculas mais importantes na sinalização em biologia celular e sua regulação rígida no meio intracelular ocorre por meio de sequestro e extrusão, processos que são cruciais para a função celular. Dado esse papel essencial dos íons Ca^{2+} mediando injúria glutamatérgica, a disfunção de maquinarias relacionadas à regulação do Ca^{2+} pode exacerbar a concentração de Ca^{2+} intracelular e contribuir para excitotoxicidade (LAI, 2014).

A transmissão sináptica no cérebro de mamíferos ocorre predominantemente através da ativação de receptores glutamatérgicos, mediada pela ativação pós-sináptica de receptores do tipo AMPA e NMDA. Já foi demonstrado que após 40 minutos de insulto isquêmico e 1 hora de reperfusão ocorre a remoção da subunidade GluR1 da membrana e que essa subunidade é internalizada, mas não é degradada (BESKE, 2015). Nossos resultados mostraram uma pequena, mas não

significativa, diminuição da subunidade GluR1 na membrana. Entretanto, observamos um aumento da quantidade citoplasmática de GluR1, o que está de acordo com a literatura, indicando somente a internalização de GluR1 sem subsequente degradação após 40 minutos de isquemia e 1 hora de reperfusão. Nossos resultados foram os primeiros a mostrar que o tratamento com Ang-(1-7) aumenta a quantidade da subunidade GluR1 citoplasmática no grupo controle tratado com Ang-(1-7). Esse dado é muito interessante, pois já foi demonstrado que após 2 horas de reperfusão não é observada diminuição da pressão do mRNA de GluR1, entretanto, ocorre diminuição de mRNA para GluR1 a partir de 12 horas após o insulto isquêmico e essa diminuição de mRNA para GluR1 persiste por até 4 semanas após o insulto isquêmico (DIJK, 2004). Então o efeito da Ang-(1-7) de aumentar a expressão de GluR1 seria interessante em um tratamento pós isquêmico. Em 2007, (TANG *et al.*, 2007) mostraram que ratos submetidos à MCAO e uma posterior intervenção chamada “willed movement”, que é definido como o movimento a que um indivíduo presta atenção e faz um esforço para realizar e atinge um objetivo, demonstravam uma melhor de aquisição de escalada (a cada ponto de tempo testado), melhora na mobilidade dos membros anteriores e funções neurológicas na fase subaguda do MCAO e esses ratos tinham mRNA para GluR1 e GluR4 *upregulated* de forma significativa em comparação com ratos do grupo MCAO.

A expressão da subunidade GluR1 do receptor AMPA é necessária para potenciação de longa duração (MANUSCRIPT *et al.*, 2013), além disso já foi demonstrado que os níveis de Ang-(1-7) estão diminuídos no cérebro de camundongos SAMP8, modelo de doença de Alzheimer, e que essa diminuição nos níveis de Ang-(1-7) estão correlacionadas com déficits cognitivos (JIANG *et al.*, 2016). Nossos resultados demonstram que a Ang-(1-7) é capaz de modular a quantidade da subunidade GluR1, no entanto, mais pesquisa é necessária para avaliar os mecanismos intracelulares envolvidos com essa modulação da quantidade de subunidades de AMPAr relacionados com a presença da Ang-(1-7).

As características funcionais dos receptores do tipo AMPA são determinadas principalmente pelas subunidades que compõe o canal. A presença da subunidade GluR2 determina a linearidade da relação entre corrente e voltagem e gera baixa condutância ao Ca^{2+} (TRAYNELIS, 2014). A grande maioria dos AMPAr no

hipocampo, especialmente na região CA1, é impermeável a Ca^{2+} (SEEBURG *et al.*, 2001). Esses receptores contêm a forma editada (Q607R) da subunidade GluR2, que permite uma baixa permeabilidade a cátions bivalente. Diversas pesquisas têm demonstrado que durante o processo de isquemia/reperfusão ocorre morte neuronal tardia decorrente da ativação de AMPAr permeáveis a Ca^{2+} e Zn^{2+} (CALDERONE, A., 2004; LIU, S. *et al.*, 2004), essa perda da subunidade GluR2 na membrana leva à uma maior susceptibilidade do tecido à morte neuronal. Sabe-se que mudança dos receptores AMPA impermeáveis à Ca^{2+} e Zn^{2+} por AMPAr permeáveis à Ca^{2+} e Zn^{2+} ocorre devido a remoção e subsequente degradação da subunidade GluR2 (DIXON *et al.*, 2009a), com isso, ocorre inserção de AMPAr sem a subunidade GluR2 na membrana plasmática, além de diminuição da transcrição de GluR2 (GORTER *et al.*, 1997). Após isquemia, a região CA1 do hipocampo, particularmente, fica com a expressão de RNA mensageiro para GluR2 reduzida (GORTER, 1997). O processo pelo qual a subunidade GluR2 sofre *downregulation* está relacionada com o repressor transcricional REST, que medeia a morte celular pós-isquêmica em neurônios através da supressão da transcrição da proteína GluR2 (CALDERONE, AGATA, 2003) e de processos de edição de proteínas envolvidos em deixar a subunidade GluR2 (Q607R) impermeável a condução de cátions divalentes (PENG *et al.*, 2006)

Nossos resultados mostram que a administração de Ang-(1-7) durante o processo isquêmico previne a internalização da subunidade GluR2 do receptor AMPA em fatias de hipocampo. Apesar de não ter sido observada diminuição significativa na expressão da subunidade GluR2 citoplasmática, estudos anteriores têm demonstrado que essa subunidade é degradada após o processo de internalização (BESKE, 2015). Atualmente, estudos sugerem que os mecanismos responsáveis pela troca e degradação da subunidade GluR2 durante o processo de isquemia/reperfusão estão envolvidos com o aumento na atividade da enzima NADPH oxidase, responsável pela síntese de espécies reativas de oxigênio. A NADPH oxidase medeia uma cascata de sinalização envolvida com estresse oxidativo responsável pelo sequestro de GluR1 e GluR2 dependente de clatrina. A degradação da subunidade GluR2 parece estar inicialmente envolvida com o sequestro desta subunidade do receptor AMPA. Estudos recentes têm demonstrado que a internalização de AMPAr é dependente da endocitose mediada por

MAPK38/Rab5 de uma forma dinâmica dependente de clatrina (CAVALLI *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2004; ZHONG *et al.*, 2008)

Ativação da MAPK38 induzida pela NADPH oxidase medeia os mecanismos envolvidos com o sequestro de GluR1 e GluR2. A atividade da NADPH oxidase após OGD/R promove remoção de GluR2 da membrana através do aumento na fosforilação da Ser880 da subunidade GluR2. Essa fosforilação da Ser880 ocorre através da ativação da PKC α , no entanto, a inibição da atividade da enzima NADPH oxidase durante OGD/R diminui a ativação de PKC α e diminui também a colocalização entre PKC α e PICK1, atenuando o aumento na fosforilação de Ser880 de GluR2 dependente de OGD/R.

Mais estudos são necessários para determinar os mecanismos precisos pelos quais a Ang-(1-7) promove neuroproteção e prevenção da internalização da subunidade GluR2. A primeira possibilidade envolve a modulação da NADPH oxidase pela Ang-(1-7). ZHENG, J. L., em 2014, demonstrou que processo de OGD causa aumento na expressão das isoformas da NADPH oxidase Nox2 e Nox4, no entanto, o tratamento com Ang-(1-7) de fatias de cérebro durante o processo de OGD previne o aumento da expressão dessas isoformas da NADPH oxidase em modelos de isquemia. Uma possibilidade para a ação da Ang-(1-7) em prevenir a internalização e degradação da subunidade GluR2 pode estar ligada aos efeitos da Ang-(1-7) em prevenir o aumento da expressão da enzima NADPH oxidase, diminuindo conseqüentemente a internalização da subunidade GluR2 e fazendo com que os AMPAr permaneçam impermeáveis ao Ca²⁺.

Além disso, a diminuição na fosforilação da Ser880 que pode ser observada com a inibição da NADPH oxidase durante OGD/R também resulta em diminuição da interação entre GluR2 e PICK1, aliado a manutenção da associação de GluR2 com as proteínas de ancoramento à membrana, GRIP1/ABP, resultando na prevenção da perda da subunidade GluR2 induzida por OGD/R (BESKE, 2015)

A segunda possibilidade envolve a modulação redox direta da enzima PKC via espécies reativas de oxigênio, possivelmente geradas pela NADPH oxidase. Alguns artigos publicados demonstram que a atividade da PKC está aumentada

durante o estresse oxidativo (WARD *et al.*, 1998), o que pode ser prevenido usando tratamentos antioxidantes, como apocinina (TUTTLE *et al.*, 2009). É interessante que dados na literatura mostram que a Ang-(1-7) também modula a atividade de PKC, a administração de Ang-(1-7) pode diminuir a atividade de PKC em células vasculares lisas (ZHONG J, ZHU ZM, 2001), contrabalançando os efeitos causados pela Ang II, que causa aumento da atividade da enzima PKC, mais especificamente a PKC α no néfron proximal (BOESCH *et al.*, 2001).

Assim como a isquemia induz diminuição da expressão de RNAm de GluR2 e endocitose de GluR2, levando ao aumento do influxo de Ca²⁺ mediado pelos receptores AMPA em neurônios hipocâmpais da região CA1 (GORTER, 1997), o estímulo com o agonista AMPA também induz endocitose de receptor AMPA. Nossos resultados mostraram que o estímulo com o agonista AMPA (100 μ M) induz morte celular, assim como descrito na literatura (KRISTENSEN, 2001), mas nossos resultados são os primeiros a demonstrar que o tratamento com Ang-(1-7) durante o estímulo com agonista AMPA previne a morte celular estimulada pelo agonista. Em, 2000, LIN *et al.*, demonstraram que o estímulo com agonista AMPA induz internalização do receptor AMPA, que pode ser inibido em 35% por antagonista competitivo, CNQX, e em 50% por nipomidina, mostrando que essa internalização de receptor AMPA estimulada pelo agonista AMPA consiste de dois componentes: um dependente da ocupação do sítio glutamatérgico e um mediado por ativação de receptor AMPA e subsequente despolarização e influxo de Ca²⁺ através de canais de Ca²⁺ voltagem dependente. Uma possível explicação para diminuição de morte celular induzida por agonista AMPA causada pela Ang-(1-7) é a diminuição da internalização da subunidade GluR2 causada pela Ang-(1-7). Assim como a Ang-(1-7) previne internalização da subunidade GluR2 mediante o insulto isquêmico, ela também poderia diminuir a internalização da subunidade GluR2 mediada por agonista AMPA.

6. CONCLUSÃO

O estudo apresentado nos permite concluir que, no modelo experimental de isquemia *in vitro* o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de proteger fatias

hipocampais submetidas ao protocolo de OGD e essa neuroproteção é dependente da ativação do receptor Mas. Como possíveis mecanismos para este efeito, podemos concluir que a Ang-(1-7) previne a excitotoxicidade glutamatérgica, previne internalização e degradação da subunidade GluR2 do receptor AMPA e previne a morte celular induzida pelo agonista AMPA.

7. BIBLIOGRAFIA

- AARTS, M. M.; ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Novel concepts in excitotoxic neurodegeneration after stroke. *Expert rev. Mol. Med.*, v. 5, n. December, p. 1–22, 2003.
- ABWAINY, A. *et al.* Endogenous angiotensin-(1-7)/Mas receptor/NO pathway mediates the cardioprotective effects of pacing postconditioning. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 310, n. 1, p. H104-12, jan. 2016.
- ALLEN, N. B. *et al.* Regional variation in recommended treatments for ischemic stroke and TIA: Get with the guidelines-stroke 2003-2010. *Stroke*, v. 43, n. 7, p. 1858–1864, 2012.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, v. 34, n. 4–5, p. 325–337, 2003.
- AYALON, G.; STERN-BACH, Y. Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron*, v. 31, n. 1, p. 103–113, 2001.
- BARON, J. C. Mapping the ischemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, v. 9, p. 193–201, 1999.
- BASS, B. L. RNA editing by adenosine deaminates that act on RNA. *Annual review of biochemistry*, v. 71, n. I, p. 817–846, 2007.
- BECKER, L. K. *et al.* Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 293, n. 3, p. H1416–H1424, 2007.
- BELACHEW, S.; GALLO, V. Synaptic and extrasynaptic neurotransmitter receptors in glial precursors' quest for identity. *Glia*, v. 48, n. 3, p. 185–196, 2004.
- BENNETT, J. A.; DINGLELINE, R. Topology profile for a glutamate receptor: Three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron*, v. 14, n. 2, p. 373–384, 1995.
- 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.
- BERDICHEVSKY, E. *et al.* Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neuroscience letters*, v. 36, n. 1, p. 75–80, mar. 1983.

- BESKE, P. H. *et al.* Identification of NADPH oxidase as a key mediator in the post-ischemia-induced sequestration and degradation of the GluA2 AMPA receptor subunit. *J Neurochem*, v. 132, n. 5, p. 504–519, 2015.
- BICKLER, P. E.; FAHLMAN, C. S. Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons. *Neuroscience*, v. 127, n. 3, p. 673–683, 2004.
- BOESCH, D. M.; GARVIN, J. L. Age-dependent activation of PKC isoforms by angiotensin II in the proximal nephron. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 281, n. 3, p. R861-7, set. 2001.
- BORGES, K.; DINGLEDINE, R. Functional Organization of the GluR1 Glutamate Receptor Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 28, p. 25929–25938, 2001.
- BRADFORD, M. M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRODERICK, J. *et al.* Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage in Adults: 2007 Update: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, High Blood Pressure Research Council, and the Quality of Care and Out. *Stroke*, v. 38, n. 6, p. 2001–2023, 2007.
- BRONGHOLI, K. *et al.* Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices. *Brain research*, v. 1083, n. 1, p. 211–8, abr. 2006.
- BRORSON, J. R.; LI, D.; SUZUKI, T. Selective Expression of Heteromeric AMPA Receptors Driven by Flip – Flop Differences. *Culture*, v. 24, n. 14, p. 3461–3470, 2004.
- BUDD, S.; NICHOLLS, D. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem*, v. 67, n. 6, p. 2282–91, 1996.
- CALDERONE, A. *et al.* Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 23, n. 6, p. 2112–2121, 2003.
- CALDERONE, A. Late Calcium EDTA Rescues Hippocampal CA1 Neurons from Global Ischemia-Induced Death. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 44, p. 9903–9913, 2004.
- CAMACHO, A.; MASSIEU, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Archives of Medical Research*, v. 37, n. 1, p. 11–18, 2006.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *et al.* Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 257, n. 1, p. H324–H329, jul. 1989.
- CAVALLI, V. *et al.* The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Molecular cell*, v. 7, n. 2, p. 421–32, fev. 2001.

- CHAPLEAU, M. W.; ABBOUD, F. M. Neuro-cardiovascular regulation: from molecules to man. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 940, p. xiii–xxii, 2001.
- CHAPPELL, M. *et al.* 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, out. 1989.
- CHAPPELL, M. C. *et al.* Identification of Angiotensin-(1-7) in Rat Brain. v. 264, n. 28, p. 16518–16523, 1989.
- CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 7, p. 372–382, 2000.
- CHOL, D. W. Calcium : still centerslstage in hypoxbischemic neuronal death. n. 2, p. 2–4, 1995.
- CHUNG, H. J. *et al.* Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 20, n. 19, p. 7258–7267, 2000.
- DAWSON, L. . *et al.* Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research Bulletin*, v. 53, n. 6, p. 767–776, 2000.
- DIJK, F.; KRAAL-MULLER, E.; KAMPHUIS, W. Ischemia-Induced Changes of AMPA-Type Glutamate Receptor Subunit Expression Pattern in the Rat Retina: A Real-Time Quantitative PCR Study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v. 45, n. 1, p. 330–341, 2004.
- DIXON, R. M.; MELLOR, J. R.; HANLEY, J. G. PICK1-mediated Glutamate Receptor Subunit 2 (GluR2) Trafficking Contributes to Cell Death in Oxygen / Glucose-deprived Hippocampal Neurons *. v. 284, n. 21, p. 14230–14235, 2009a.
- DIXON, R. M.; MELLOR, J. R.; HANLEY, J. G. PICK1-mediated glutamate receptor subunit 2 (GluR2) trafficking contributes to cell death in oxygen/glucose-deprivedhippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 21, p. 14230–14235, 2009b.
- DONG, H. *et al.* GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature*. [S.l: s.n.]. , 1997
- DONOGHUE, M. *et al.* A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related to Angiotensin 1-9. *Circulation Research*, v. 87, p. 1–9, 2000.
- DOOBAY, M. F. *et al.* Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 292, n. 1, p. R373-81, 2007.
- FALLUJI, N. *et al.* Reperfusion strategies for acute ischemic stroke. *Angiology*, v. 63, n. 4, p. 289–296, 2012.
- FARIA-SILVA, R.; DUARTE, F. V; SANTOS, R. A. S. Short-Term Angiotensin(1-7) Receptor Mas Stimulation Improves Endothelial Function in Normotensive Rats. *Hypertension*, v. 46, p. 948–952, 2005.
- FENG, Y. *et al.* Brain-selective overexpression of human angiotensin-converting enzyme type 2

- attenuates neurogenic hypertension. *Circulation Research*, v. 106, n. 2, p. 373–382, 2010.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ, D. *et al.* Immature rat brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 145, n. 1–2, p. 205–212, 2005.
- FERRARIO, C. M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): An evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*, v. 47, n. 3 II, p. 515–521, 2006.
- FERRARIO, C. M.; VARAGIC, J. The ANG-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 298, n. 6, p. F1297-305, 2010.
- FITZSIMONS, B. Y. J. T. DRINKING OF PEPTIDE PRECURSORS AND OF SHORTER CHAIN PEPTIDE FRAGMENTS OF ANGIOTENSIN II INJECTED INTO THE RAT ' S DIENCEPHALON From the Physiological Laboratory , Downing Street , Cambridge anterior diencephalon causes the rat to drink water . In the pres. p. 295–303, 1971.
- FOLBERGROVÁ, J. *et al.* N-tert-butyl-alpha-phenylnitron improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 11, p. 5057–5061, 1995.
- GALLAGHER, P. E. *et al.* Distinct roles for ANG II and ANG- (1 – 7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 1032, p. 420–426, 2006.
- GIRONACCI, M. M. *et al.* Angiotensin-(1-7) Reduces Norepinephrine Release Through a Nitric Oxide Mechanism in Rat Hypothalamus. *Hypertension*, p. 1248–1253, 2000.
- GLOBUS, M. Y. *et al.* Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *Journal of neurochemistry*, v. 51, n. 5, p. 1455–64, nov. 1988.
- GORTER, J. A *et al.* Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 17, n. 16, p. 6179–6188, 1997.
- GREGER, I. H.; KHATRI, L.; ZIFF, E. B. RNA editing at Arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron*, v. 34, n. 5, p. 759–772, 2002.
- GROOMS, S. Y. *et al.* Activity bidirectionally regulates AMPA receptor mRNA abundance in dendrites of hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 26, n. 32, p. 8339–8351, 2006.
- HAMMING, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology*, v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004.
- HUANG, C.-C. *et al.* Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *The Journal of biological chemistry*, v. 279, n. 13, p. 12286–92, mar. 2004.

- IADECOLA, C.; DAVISSON, R. L. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell metabolism*, v. 7, n. 6, p. 476–84, jun. 2008.
- ISAAC, J. T. R.; ASHBY, M.; MCBAIN, C. J. The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron*, v. 54, n. 6, p. 859–871, 2007.
- IWATA, M. *et al.* Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 289, n. 6, p. H2356–H2363, 2005.
- JIA, Y. *et al.* Zn²⁺ currents are mediated by calcium-permeable AMPA/kainate channels in cultured murine hippocampal neurones. *The Journal of physiology*, v. 543, n. Pt 1, p. 35–48, 2002.
- JIANG, T. *et al.* Angiotensin-(1-7) is Reduced and Inversely Correlates with Tau Hyperphosphorylation in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*, v. 53, n. 4, p. 2489–97, maio 2016.
- JIANG, T. *et al.* Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, v. 167, n. 7, p. 1520–1532, 2012.
- JIANG MH *et al.* Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Res.*, v. Aug 9, n. 946(1), p. 139–47, 2002.
- JUURLINK, B. H. J.; SWEENEY, M. I. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 21, n. 2, p. 121–128, 1997.
- KACHARMINA, J. E. *et al.* Stimulation of glutamate receptor protein synthesis and membrane insertion within isolated neuronal dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 21, p. 11545–50, 2000.
- KAGIYAMA, T.; KAGIYAMA, S.; PHILLIPS, M. I. Expression of angiotensin type 1 and 2 receptors in brain after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Regulatory Peptides*, v. 110, n. 3, p. 241–247, 2003.
- KAR, S.; GAO, L.; ZUCKER, I. H. Exercise training normalizes ACE and ACE2 in the brain of rabbits with pacing-induced heart failure. *Journal of Applied Physiology*, v. 108, n. 4, p. 923–932, 2010.
- KARAMYAN, V. T.; SPETH, R. C. Enzymatic pathways of the brain renin-angiotensin system: Unsolved problems and continuing challenges. *Regulatory Peptides*, v. 143, n. 1–3, p. 15–27, 2007.
- KAWAHARA, Y. *et al.* Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *European Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 1, p. 23–33, 2003.
- KOIKE, M.; IINO, M.; OZAWA, S. Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca²⁺-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience research*, v. 29, n. 1, p. 27–36, 1997.

- KRISTENSEN, B. W. Comparison of excitotoxic profiles of ATPA , AMPA , KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. v. 917, p. 21–44, 2001.
- KUCHAREWICZ, I. *et al.* Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension*, v. 40, n. 5, p. 774–9, nov. 2002.
- KUMAR, M. *et al.* Selective expression of c-mas proto-oncogene in rat cerebral endothelial cells. *Neuroreport*, v. 8, n. 1, p. 93–6, dez. 1996.
- LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, v. 115, p. 157–188, 2014.
- LEE, H. K. *et al.* Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*, v. 112, n. 5, p. 631–643, 2003.
- LEITE, H. R. *et al.* Swim training attenuates oxidative damage and promotes neuroprotection in cerebral cortical slices submitted to oxygen glucose deprivation. *Journal of neurochemistry*, v. 123, n. 2, p. 317–24, out. 2012.
- LIN, J. W. *et al.* Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nature neuroscience*, v. 3, n. 12, p. 1282–1290, 2000.
- LIU, G. C. *et al.* Angiotensin-(1-7)-induced activation of ERK1/2 is cAMP/protein kinase A-dependent in glomerular mesangial cells. *AJP: Renal Physiology*, v. 302, p. F784–F790, 2012.
- LIU, S. *et al.* Expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron*, v. 43, n. 1, p. 43–55, 2004.
- LOZANO, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, v. 380, n. 9859 IF-33676_287_mortality causes-global burden of disease study 2010.pdf_FG-0, p. 2095–2128, 2013.
- 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.
- LU, J.; ZHANG, Y.; SHI, J. Effects of intracerebroventricular infusion of angiotensin-(1-7) on bradykinin formation and the kinin receptor expression after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Brain research*, v. 1219, p. 127–35, 11 jul. 2008.
- LU, W.; ZIFF, E. B. PICK1 interacts with ABP/GRIP to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, v. 47, n. 3, p. 407–421, 2005.
- LULA, I. *et al.* Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its β -cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. *Peptides*, v. 28, n. 11, p. 2199–2210, 2007.
- MACHADO-SILVA, A. *et al.* Therapeutic uses for Angiotensin- (1-7). v. 3776, n. May, 2016.
- MANSOUR, M. *et al.* Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit

- stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron*, v. 32, n. 5, p. 841–853, 2001.
- MANUSCRIPT, A.; UNSILENCING, S. Glutamate Receptor Subunit GluA1 is Necessary for Long-term Potentiation and Synapse Unsilencing, but not Long-term Depression in Mouse Hippocampus. p. 8–14, 2013.
- MATSUDA, S. *et al.* Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *The EMBO journal*, v. 19, n. 12, p. 2765–74, jun. 2000.
- MEHTA, A. *et al.* Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, v. 698, n. 1–3, p. 6–18, 2013.
- METZGER, R. *et al.* Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Letters*, v. 357, n. 1, p. 27–32, 1995.
- MITANI, A. *et al.* Gerbil hippocampal extracellular glutamate and neuronal activity after transient ischemia. *Brain research bulletin*, v. 25, n. 2, p. 319–24, ago. 1990.
- MONETTE, R. *et al.* A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Research Protocols*, v. 2, n. 2, p. 99–108, 1998.
- MOURÃO, F. A. G. *et al.* Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to in vitro ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. *Journal of neurochemistry*, v. 131, n. 1, p. 65–73, out. 2014.
- MYERS, S. J. *et al.* Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 18, n. 17, p. 6723–6739, 1998.
- NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *Journal of neurochemistry*, v. 49, n. 1, p. 50–57, 1987.
- NOORIAN, A. R. *et al.* Initial experience with upfront arterial and perfusion imaging among ischemic stroke patients presenting within the 4.5-hour time window. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases: the official journal of National Stroke Association*, v. 23, n. 2, p. 220–4, fev. 2014.
- PEI, W. *et al.* Flip and flop: A molecular determinant for AMPA receptor channel opening. *Biochemistry*, v. 48, n. 17, p. 3767–3777, 2009.
- PENG, P. L. *et al.* ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron*, v. 49, n. 5, p. 719–733, 2006.
- PEREZ, J. L. *et al.* PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 21, n. 15, p. 5417–28, 2001.
- REGENHARDT, R. W. *et al.* Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke.

Neuropharmacology, v. 71, p. 154–63, ago. 2013.

- REGENHARDT, R. W. *et al.* Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Experimental physiology*, v. 99, n. 2, p. 442–53, 2014.
- SAMPAIO, W. O. *et al.* Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, v. 49, n. 1, p. 185–192, 2007.
- SANS, N. *et al.* Aberrant formation of glutamate receptor complexes in hippocampal neurons of mice lacking the GluR2 AMPA receptor subunit. *The Journal of ...*, v. 23, n. 28, p. 9367–9373, 2003.
- SANTOS, R. A. S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 14, p. 8258–63, 2003.
- SANTOS, R. A. S. *et al.* angiotensin- (1 – 7) and Mas : new players of the renin – angiotensin system. 2013.
- SANTOS, R. A. S. *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, v. 11, p. 153–157, 1988.
- SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; SIMÕES E SILVA, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental Physiology*, v. 93, n. 5, p. 519–527, 2008.
- SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 24, n. 4, p. 351–71, 2004.
- 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.
- SEEBURG, P. H. *et al.* Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. *Brain research*, v. 907, n. 1–2, p. 233–43, jul. 2001.
- SHEPHERD, J. D.; HUGANIR, R. L. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 23, p. 613–643, 2007.
- SHIGEMOTO, R.; KINOSHITA, A. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. ... *of Neuroscience*, v. 17, n. 19, p. 7503–7522, 1997.
- SHIMADA, K. *et al.* Angiotensin-(1-7) protects against the development of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 35, n. 7, p. 1163–1168, 2015.
- SMITH, S. C. Reducing the global burden of ischemic heart disease and stroke: a challenge for

- the cardiovascular community and the United Nations. *Circulation*, v. 124, n. 3, p. 278–9, jul. 2011.
- SOMMER, B. *et al.* Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*, v. 249, n. 4976, p. 1580–5, 1990.
- 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.
- STAVROVSKAYA, I. G.; KRISTAL, B. S. The powerhouse takes control of the cell: Is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 38, n. 6, p. 687–697, 2005.
- STRAWN, W. B.; FERRARIO, C. M.; TALLANT, E. A. After Vascular Injury. p. 1–6, 1999.
- TANAKA, H. *et al.* The AMPAR subunit GluR2: Still front and center-stage. *Brain Research*, v. 886, n. 1–2, p. 190–207, 2000.
- TANG, Q. *et al.* The effects of willed movement therapy on AMPA receptor properties for adult rat following focal cerebral ischemia. *Behavioural brain research*, v. 181, n. 2, p. 254–61, ago. 2007.
- TERASHIMA, A. *et al.* An Essential Role for PICK1 in NMDA Receptor-Dependent Bidirectional Synaptic Plasticity. *Neuron*, v. 57, n. 6, p. 872–882, 2008.
- TERASHIMA, A. Regulation of Synaptic Strength and AMPA Receptor Subunit Composition by PICK1. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 23, p. 5381–5390, 2004.
- TIPNIS, S. R. *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 43, p. 33238–33243, 2000.
- TRAYNELIS, S. F. *et al.* Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. 2014.
- TSUZUKI, K. *et al.* Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, v. 77, n. 6, p. 1650–1659, 2001.
- TUTTLE, K. R. *et al.* Oxidative stress mediates protein kinase C activation and advanced glycation end product formation in a mesangial cell model of diabetes and high protein diet. *American journal of nephrology*, v. 29, n. 3, p. 171–80, 2009.
- VAN HARREVELD, A. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *Journal of neurochemistry*, v. 3, n. 4, p. 300–15, fev. 1959.
- VAUQUELIN, G. *et al.* Cellular targets for angiotensin II fragments: pharmacological and molecular evidence. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*, v. 3, n. 4, p. 195–204, 2002.
- VICKERS, C. *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting

- enzyme-related carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 17, p. 14838–14843, 2002.
- WANG, H. *et al.* Signaling pathways leading to ischemic mitochondrial neuroprotection. *J Bioenerg Biomemb*, v. 2, n. 2, p. 101–110, 2015.
- WANG, L. *et al.* Ang-(1-7) offers cytoprotection against ischemia-reperfusion injury by restoring intracellular calcium homeostasis. *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 63, n. 3, p. 259–64, mar. 2014.
- WARD, N. E. *et al.* Irreversible inactivation of protein kinase C by glutathione. *The Journal of biological chemistry*, v. 273, n. 20, p. 12558–66, maio 1998.
- WHITE, R. J.; REYNOLDS, I. J. Mitochondria accumulate Ca²⁺ following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurones. *The Journal of physiology*, v. 498 (Pt 1, p. 31–47, 1997.
- WHITE, R. J.; REYNOLDS, I. J. Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 15, n. 2, p. 1318–28, 1995.
- WHITE, R. J.; REYNOLDS, I. J. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 16, n. 18, p. 5688–5697, 1996.
- WIEMER, G. *et al.* AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension*, v. 40, n. 6, p. 847–852, 2002.
- WILLIAMS, B. Drug discovery in renin – angiotensin system intervention : past and future. p. 1–8, 2016.
- WRIGHT, A.; VISSEL, B. The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Frontiers in molecular neuroscience*, v. 5, n. April, p. 34, 2012.
- XU, P.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E. ACE2 / ANG- (1 – 7)/ Mas pathway in the brain : the axis of good. v. 70112, p. 804–817, 2011.
- YANG J *et al.* Endogenous activated angiotensin-(1-7) plays a protective effect against atherosclerotic plaques unstability in high fat diet fed ApoE knockout mice. *Int J Cardiol*, v. Apr 1, n. 184, p. 645–52, 2015.
- YOUNG, D. *et al.* Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 85, n. 14, p. 5339–42, jul. 1988.
- 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, n. 5–6, p. 593–600, jan. 2008.
- ZHENG, J. *et al.* Activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas pathway reduces oxygen- glucose deprivation induced tissue swelling, ROS production, and cell death in mouse brain with

angiotensin II overproduction. *Neuroscience*, v. 273, p. 39–51, 2014.

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, n. 5, p. 452–459, 2014.

ZHONG, P. *et al.* Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. *The Journal of physiology*, v. 586, n. 18, p. 4465–79, set. 2008.

ZHONG J, ZHU ZM, Y. Y. Inhibition of PKC and ERK1/2 in cultured rat vascular smooth muscle cells by angiotensin-(1-7). *Sheng Li Xue Bao*, v. Oct;53(5), p. 361–3, 2001.

ZIMMERMAN, M. C. *et al.* Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circulation research*, v. 95, n. 2, p. 210–6, jul. 2004.