

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

O ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PARA
ANGIOTENSINA II DO TIPO 1 (AT₁) NAS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS OBSERVADAS COM O
ENVELHECIMENTO E NA DOENÇA DE PARKINSON

PAULO ALEXANDRE DE OLIVEIRA

Florianópolis

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**O ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PARA
ANGIOTENSINA II DO TIPO 1 (AT₁) NAS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS OBSERVADAS COM O
ENVELHECIMENTO E NA DOENÇA DE PARKINSON**

PAULO ALEXANDRE DE OLIVEIRA

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger

Coorientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

DE OLIVEIRA, PAULO ALEXANDRE

O ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PARA ANGIOTENSINA II DO TIPO 1 (AT1) NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS OBSERVADAS COM O ENVELHECIMENTO E NA DOENÇA DE PARKINSON / PAULO ALEXANDRE DE OLIVEIRA ; orientador, RUI DANIEL SCHRODER PREDIGER ; coorientador, REINALDO NAOTO TAKAHASHI. - Florianópolis, SC, 2016.

133 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA. 3. LOSARTANA. 4. DIMERIZAÇÃO. 5. OLIGOMERIZAÇÃO. I. PREDIGER, RUI DANIEL SCHRODER. II. TAKAHASHI, REINALDO NAOTO. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. IV. Título.

“O envolvimento dos receptores para angiotensina II do tipo 1 (AT1) nas alterações comportamentais observadas com o envelhecimento e na doença de Parkinson”

Por

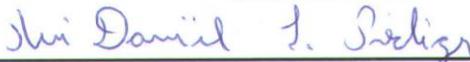
Paulo Alexandre de Oliveira

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (10/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

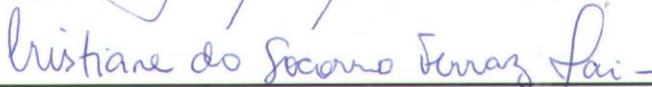
Banca examinadora:



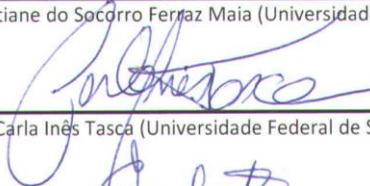
Dr(a) Rui Daniel Schroder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



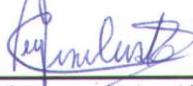
Dr(a) Lisiane Porciúncula (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)



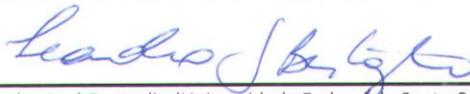
Dr(a) Cristiane do Socorro Ferraz Maia (Universidade Federal do Pará)



Dr(a) Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) José Eduardo da Silva Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Leandro José Bertoglio (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 08 de abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Rosa e Felipe, ao meu irmão Joce, a minha cunhada Carol e a Malu (que está por chegar, mas já amamos muito), pelo apoio incondicional e pelo incentivo em todas as etapas.

Ao professor Dr. Rui Daniel S. Prediger, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, de realizar este trabalho sob a sua orientação, pela amizade, pelas diversas oportunidades e pela confiança. Muito obrigado!

Ao professor Dr. Reinaldo N. Takahashi, por aceitar ser meu coorientador e por ter depositado em mim a sua confiança.

Ao professor Dr. Francisco Ciruela, pela colaboração e amizade durante o tempo que trabalhamos juntos durante o meu doutorado sanduíche na Universidade de Barcelona e pelos valiosos ensinamentos.

A Dra. Ana Carolina Vanvossen, certamente foi a mais grata surpresa que me foi reservada em Florianópolis, um verdadeiro Anjo que Deus colocou no meu caminho. Se eu tentasse definir o quão especial tu és para mim, palavras não teriam fim...então eu direi apenas obrigado!

Aos meus amigos Ana C. G. de Souza, Filipe C. Matheus, Samantha C. Lopes e Thiago Pereira que foram extremamente importantes durante esta caminhada.

A professora Dra. Patrícia Pereira, minha “mãe científica”, muito obrigado pela primeira oportunidade na Ciência, pelo incentivo e por sempre acreditar em mim.

A Carolina Cover, que me transmitiu o amor pela pesquisa e foi uma das grandes incentivadoras para que eu iniciasse e trilhasse este caminho.

As Professoras doutoras Elaine Del Bel e Rita Raisman-Vozari, pela colaboração e por contribuírem com o meu crescimento científico.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC que contribuíram com os seus ensinamentos para a minha formação científica.

A Karla Lorena Guarido, pela amizade e contribuição neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) Aderbal Silva Aguiar Jr, Ana Cristina Guerra de Souza, Ana Elisa Speck, Andréia Cunha, Angela França, Daniel Rial, Eduardo Moreira, Filipe Matheus, Fernanda Barros, Josiel Mack, Jozimar Szczepanik, Juliana Ben, Marissa Shamme, Morgana Moretti, Samantha Lopes, Sandro Wopereis, Tuane Sampaio e Vanessa

Valgas, que certamente contribuíram de uma forma ou de outra para o meu crescimento pessoal e científico.

As grandes pessoas que tive a oportunidade de conhecer e conviver durante estes anos de Pós-Graduação na UFSC: Nelson o Único, Adalba Castro, Glauber Eiji, Marcela Sales, Rodrigo Prim, Fabricio Pamplona, Pablo Pandolfo, Rafael Bitencourt, Cristiane Ribeiro, Rafael Scoz, Maíra Bicca, Ana Paula R. Costa, Renata Marchette, Vagner Linartevichi, Felipe Vanz, Lucas Mascarin, Franci Ellen Fin, Flora Lucena, Bruno Leal, Taciane Leal, Francisney Nascimento, Roger Walz, Marcelo Liborio, Alexandre Hoeller, Ricardo Sachser, Manuel de Pra, Rene Piornedo, Mariju Bianchini e Carolina Eto.

Aos colegas de Laboratório de Farmacologia em Barcelona, Xavi, Maricel, Marc, Silvia e Victor, que tornaram minha passagem em Barcelona mais prazerosa e pela contribuição para o meu crescimento pessoal e científico. Gracias!

A Debora Lanznaster, que foi muito importante durante a minha adaptação em Barcelona, e com valiosas dicas sobre todos os processos junto à CAPES.

Aos funcionários da UFSC, Cláudia e Sérgio, por sempre me receberem com um sorriso no rosto e um desejo de bom dia, dando entusiasmo para encarar mais um dia e que tornavam esses dias mais alegres.

Ao CNPq pelo suporte financeiro e bolsa concedida durante este período.

A CAPES pelo suporte financeiro e bolsa concedida para a realização do doutorado sanduíche no exterior.

Finalmente, a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

E acima de tudo, a Deus, fonte de luz e amor.

RESUMO

O sistema renina-angiotensina é descrito classicamente como um sistema responsável pelo controle do balanço hidroeletrólítico e da pressão arterial, sendo o principal efector a angiotensina II que ativa os receptores para angiotensina II do tipo 1 (AT₁). Recentemente, foi descrita a presença de todos os componentes do RAS no sistema nervoso central (SNC), ampliando a busca por possíveis funções fisiológicas e farmacológicas do sistema no SNC. No presente estudo foi investigado o envolvimento do receptor AT₁, através do uso de seu antagonista seletivo losartana, sobre as alterações comportamentais associadas ao envelhecimento e à doença de Parkinson (DP). Além disso, foi investigada uma possível interação proteína-proteína entre os receptores AT₁ e os receptores A_{2A} para adenosina no SNC. Inicialmente observamos que o tratamento crônico durante 22 dias com a losartana (50 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter os prejuízos relacionados ao envelhecimento observados em camundongos C57Bl/6 com 13 meses de idade nos testes do escore neurológico de severidade (ENS), labirinto em Y e localização de objetos. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis dos receptores AT₁ e AT₂ no córtex pré-frontal dos camundongos com 3 ou 13 meses de idade. Considerando o envelhecimento como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, investigamos os possíveis efeitos neuroprotetores do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) durante 22 dias em camundongos C57Bl/6 de 6 meses de idade administrados com MPTP (1 mg por narina) pela via intranasal, um modelo animal da DP. O pré-tratamento com losartana foi capaz de prevenir a morte de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal bem como as alterações comportamentais induzidas pela administração do MPTP nos testes do ENS, labirinto em Y e localização de objetos. Não foram observadas alterações nos níveis dos receptores AT₁ e AT₂ no estriado dos animais tratados com MPTP ou losartana. Em adição, através de uma série de experimentos de biologia molecular com a técnica de transferência de energia por ressonância bioluminescente e ensaio de ligação por proximidade, demonstramos pela primeira vez a ocorrência de heterodímeros dos receptores metabotrópicos AT₁ e A_{2A} em células HEK-293-T e no estriado de camundongos. Por fim, demonstramos que a administração de doses sub-efetivas de losartana e KW-6002 (antagonista seletivo dos receptores A_{2A} para adenosina) apresentam efeitos sinérgicos, reduzindo a frequência de movimentos involuntários mandibulares induzidos pela reserpina (1 mg/kg, s.c.) em camundongos Swiss adultos. Em conjunto, os resultados do presente estudo fornecem

novas evidências do envolvimento dos receptores AT₁ sobre os prejuízos comportamentais observados no envelhecimento e na DP. Além disso, o heterodímero dos receptores AT₁/A_{2A} caracterizado no presente estudo pode representar um novo alvo farmacológico para o tratamento de diversas doenças do SNC.

Palavras-chave: Sistema renina-angiotensina, receptores AT1, envelhecimento, doença de Parkinson, MPTP, comportamento, memória, receptores A2A, dimerização.

ABSTRACT

The classic renin-angiotensin system (RAS) is mainly associated with cardiovascular functions and body water regulation, with angiotensin II as its major effector acting through angiotensin II type AT₁ receptor (AT₁). It was recently disclosed the presence of all RAS components in the central nervous system (CNS), highlighting the putative physiological and pharmacological functions of RAS in the CNS. In this study, we investigated the involvement of the AT₁ receptor using the selective antagonist losartan on the behavioral changes associated with aging and Parkinson's disease (PD) in mice. Moreover, a possible protein-protein interaction between the AT₁ receptor and adenosine A_{2A} receptors in the CNS was investigated. Initially we found that chronic treatment during 22 days with losartan (50 mg / kg, i.p.) was able to reverse the age-related behavioral deficits observed in C57BL/6 mice with 13 months-old of age in the neurological severity score (NSS), Y-maze and object location tests. No significant differences were observed in AT₁ and AT₂ receptors levels in the prefrontal cortex of mice with 3 or 13 months of age. Since aging is a major risk factor to the development of neurodegenerative diseases, we investigated possible neuroprotective effects of losartan (50 mg / kg, i.p.) treatment during 22 days in C57BL/6 mice with 6 months of age. The neurotoxin MPTP was administered by the intranasal route in a dose of 1 mg per nostril, used as an animal model of PD. The pre-treatment with losartan was able to prevent the dopaminergic neuronal death in the nigrostriatal pathway as well as the behavioral impairments induced by MPTP administration evaluated in NSS, Y-maze and object location tests. No changes in the striatal levels of AT₁ and AT₂ receptors was observed following the treatments with MPTP and losartan. In addition, through a series of molecular biology studies using bioluminescence resonance energy transfer and proximity ligation assays, we demonstrated for the first time the occurrence of heterodimers of metabotropic AT₁ and A_{2A} receptors in HEK-293-T cells and in the striatum of mice. Finally, we demonstrated that the co-administration of sub-effective doses of losartan and KW-6002 (a selective A_{2A} receptor antagonist) induced synergistic effects by reducing the vacuous chewing movements induced by reserpine (1 mg / kg, s.c.) in Swiss adult mice. Altogether, these results provide new evidence of the role of AT₁ receptors on the behavioral impairments associated with aging and PD. Furthermore, the AT₁/A_{2A} receptor heterodimer characterized in this study may represent a novel target for pharmacological treatment of various CNS disorders.

Keywords: Renin-angiotensin system, AT1 receptors, aging, Parkinson's disease, MPTP, behavior, memory, A2A receptors, heterodimerization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona.	4
Figura 2. Aparato utilizado para a avaliação do Escore Neurológico de Severidade	14
Figura 3 Foto representativa do aparato de discriminação olfatória	16
Figura 4. Foto representativa do aparato do labirinto em Y	17
Figura 5. Foto representativa do aparato do campo aberto	18
Figura 6. Representação esquemática do teste da localização de objetos	19
Figura7. Representação esquemática do teste do esguicho	20
Figura 8. Foto representativa do aparato do rotarod	21
Figura 9. Imagens representativas da técnica de pletismografia de cauda	22
Figura 10. Primeiro protocolo experimental	24
Figura 11. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre o estado neurológico geral de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliado no teste do Escore Neurológico de Severidade	25
Figura 12. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a função olfatória de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste da discriminação olfatória.....	26
Figura 13. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) na memória de trabalho de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste do labirinto em Y	27
Figura 14. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste do campo aberto	28
Figura 15. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a memória espacial de curto prazo de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste da localização de objetos	29
Figura 16. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre comportamento relacionado a anedonia em camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliado no teste do esguicho..	30
Figura 17. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada durante 60 minutos no teste do campo aberto	31

Figura 18. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a coordenação motora de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste do rotarod	32
Figura 19. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre o peso corporal de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade	32
Figura 20. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a pressão sanguínea sistólica de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade.....	33
Figura 21. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre o imunocontéudo dos receptores para angiotensina II do tipo 1 (AT ₁ R) e do tipo II (AT ₂ R) no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade	34
Figura 22. Ilustração das principais características da DP	44
Figura 23. Figura ilustrando as principais características neuropatológicas da doença de Parkinson.....	44
Figura 24. Esquema do procedimento utilizado para a administração i.n. de MPTP	53
Figura 25. Foto representativa do teste do nado forçado	55
Figura 26. Segundo protocolo experimental	57
Figura 27. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) sobre o estado neurológico geral de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliado no teste do Escore Neurológico de Severidade.....	58
Figura 28. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) sobre a discriminação olfatória de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada no teste de discriminação olfatória.....	59
Figura 29. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) sobre a memória de trabalho de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada no teste do labirinto em Y	61
Figura 30. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) e do tratamento intranasal com MPTP (1 mg/narina) sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada no teste do campo aberto	62
Figura 31. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) e do tratamento intranasal com MPTP (1 mg/narina) sobre a memória espacial de curto prazo de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada no teste de localização de objetos.....	63

Figura 32. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1 mg/narina) no comportamento do tipo depressivo de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliado no teste do nado forçado	64
Figura 33. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1 mg/narina) na atividade locomotora espontânea de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada no teste do campo aberto	65
Figura 34. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1 mg/narina) sobre o imunocenetúdo da enzima tirosina hidroxilase (TH) e na densidade dos receptores AT-1 e AT-2 no corpo estriado de camundongos C57Bl/6	66
Figura 35. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1 mg/narina) sobre a pressão sanguínea sistólica de camundongos C57Bl/6	67
Figura 36. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1mg/narina) sobre a ingestão hídrica e diurese de camundongos C57Bl/6.....	68
Figura 37. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1 mg/narina) sobre os níveis de eletrólitos presentes na urina de camundongos C57Bl/6 ...	69
Figura 38. Esquema representativo dos diferentes tipos de oligomerização dos GPCRs.....	78
Figura 39 (A). O ensaio de imunocitoquímica realizado em células HEK-293-T que co-expressam $A_{2A}R^{CFP}$ e AT_1R^{YFP}	95
Figura 39 (B, C). Análise de BRET em células HEK-293-T que co-expressam $GABA_{B2}R^{Rluc}/AT_1R^{YFP}$ e $A_{2A}R^{Rluc}/AT_1R^{YFP}$	97
Figura 40. O ensaio de liberação de cálcio realizado em células HEK-293-T transfectadas com PcDNA3 (controle), $A_{2A}R/AT_1R$, AT_1R ou $A_{2A}R$	99
Figura 41 (A). Imagens representativas da co-localização dos receptores AT_1R , $A_{2A}R$ no estriado de camundongos.....	99
Figura 41 (B). Resultados do ensaio de PLA no corpo estriado de camundongos.....	109
Figura 42. Efeitos dos tratamentos com losartana e KW-6002 sobre os movimentos mandibulares involuntários induzidos pela reserpina (1 mg/kg, s.c.) em camundongos	100
Figura 43. Gráfico representativo dos níveis dos receptores AT_1 e A_{2A} em sinaptossomas estriatais totais de camundongos selvagens e knockouts para o receptor A_{2A}	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos dos principais receptores envolvidos nas vias de sinalização do sistema renina-angiotensina	5
Tabela 2. Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de Severidade (ENS)	15
Tabela 3. Principais fármacos utilizados atualmente para o tratamento da doença de Parkinson	46
Tabela 4. Principais antagonistas dos receptores AT ₁ para angiotensina II disponíveis comercialmente	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	-	6-hidroxi dopamina
A2A	-	Receptor para adenosina do tipo 2A
AMPc	-	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Ang 1- 7	-	Angiotensina 1-7
Ang 1-9	-	Angiotensina 1-9
Ang I	-	Angiotensina I
Ang II	-	Angiotensina II
ANOVA	-	Análise de variância
ARBs	-	Antagonistas dos receptores para angiotensina II
AT ₁	-	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AT ₂	-	Receptor de angiotensina II do tipo 2
BHE	-	Barreira hematoencefálica
BRET	-	Transferência de energia por ressonância bioluminescente
CFP	-	Proteína de fluorescência ciano
COMT	-	Catecol O-metil transferase
COX-2	-	Ciclooxigenase do tipo 2
DAG	-	Diacilglicerol
DAT	-	Transportador de dopamina
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DP	-	Doença de Parkinson
ECA	-	Enzima conversora de angiotensina
ECA 2	-	Enzima conversora de angiotensina do tipo 2
ENS	-	Escore Neurológico de Severidade
EUA	-	Estados Unidos da América
GLUT4	-	Transportadores de glicose do tipo 4
GPe	-	Globo pálido externo
GPi	-	Globo pálido interno
i.p.	-	Intraperitoneal
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP ₃	-	Inositol trifosfato
IRAP	-	Receptores de aminopeptidases de membrana regulados por insulina
L-Dopa	-	Levodopa

LPS	- Lipopolissacarídeo
LTP	- Potencialização de longo prazo
MAO-A	- Monoamino oxidase A
MAO-B	- Monoamino oxidase B
MAS 1	- Receptor pró-oncogene MAS 1
MPP ⁺	- 1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAT	- Transportador de noradrenalina
NOS	- Óxido nítrico
NST	- Núcleo subtalâmico
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PA	- Pressão arterial
PCR	- Reação de cadeia polimerase
PKC	- Proteína quinase C
PLA	- Ensaio de ligação por proximidade
Rluc	- Luciferase de <i>Rennila reniformis</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
s.c.	- Subcutâneo
SNC	- Sistema Nervoso Central
SN _{pc}	- Substância negra parte compacta
SN _{pr}	- Substância negra parte reticulada
TCE	- Traumatismo cranioencefálico
TH	- Tirosina hidroxilase
VMAT ₂	- Transportador vesicular de monoaminas do tipo 2
YFP	- Proteína de fluorescência Amarela

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO: O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	1
1.1 Uma breve contextualização histórica do sistema renina-angiotensina	1
1.2 O sistema renina-angiotensina nos dias de hoje	3
1.3 Medicamentos que atuam no sistema renina-angiotensina	5
1.4 O sistema renina-angiotensina no sistema nervoso central	6
2 CAPÍTULO 1: O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E O ENVELHECIMENTO.....	9
2.1 Introdução: Envelhecimento populacional	9
2.2 O envelhecimento e o sistema renina-angiotensina	10
2.3 Justificativa e hipótese do trabalho	12
2.4 Objetivo geral	13
2.4.1 Objetivos específicos	13
2.5 Material e Métodos.....	13
2.5.1 Animais.....	13
2.5.2 Drogas.....	13
2.5.3 Testes comportamentais	14
2.5.3.1 Avaliação do Escore Neurológico de Severidade.....	14
2.5.3.2 Teste de discriminação olfatória	15
2.5.3.3 Teste do labirinto em Y	16
2.5.3.4 Teste do campo aberto	17
2.5.3.5 Teste de realocação de objetos.....	18
2.5.3.6 Teste do esguicho (do inglês splash test).....	19
2.5.3.7 Teste do rotarod	20
2.5.4 Medida da pressão arterial.....	21
2.5.5 Teste bioquímico.....	22
2.5.5.1 Imunodeteção de proteínas: Western blotting.....	22
2.5.6 Análise estatística	23
2.5.7 Desenho experimental	23
2.6 Resultados	24
2.6.1 Escore neurológico de severidade.....	24
2.6.2 Teste de discriminação olfatória	25
2.6.3 Teste do labirinto em Y	26
2.6.4 Teste do campo aberto I.....	28
2.6.5 Teste da realocação de objetos.....	28
2.6.6 Teste do esguicho	29
2.6.7 Teste do campo aberto II	30

2.6.7 Teste do rotarod.....	31
2.6.9 Peso corpóreo	32
2.6.10 Pressão arterial sistólica	33
2.6.11 Níveis dos receptores AT ₁ e AT ₂ para angiotensina II.....	33
2.7 Discussão.....	35
2.8 Conclusão.....	41
3 CAPÍTULO 2: O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A DOENÇA DE PARKINSON.....	43
3.1 A doença de Parkinson	43
3.2 Modelos animais para o estudo da doença de Parkinson: ênfase no modelo da administração intranasal de MPTP em roedores.....	46
3.3 Sistema renina-angiotensina na Doença de Parkinson	49
3.3 Justificativa e hipótese do trabalho.....	51
3.4 Objetivo geral	52
3.4.1 Objetivos específicos	52
3.5 Material e Métodos	52
3.5.1 Animais	52
3.5.2 Drogas	53
3.5.3 Testes comportamentais	54
3.5.3.1 Avaliação do Escore Neurológico de Severidade.....	54
3.5.3.2 Teste da discriminação olfatória.....	54
3.5.3.3 Teste do labirinto em Y	54
3.5.3.4 Teste do campo aberto.....	54
3.5.3.5 Teste da Realocação de Objetos	54
3.5.3.6 Teste do nado forçado	54
3.5.4 Teste bioquímico	55
3.5.4.1 Imunodeteção de proteínas: Western blotting.....	55
3.5.5 Medidas fisiológicas	55
3.5.5.1 Pletismografia de cauda.....	55
3.5.5.2 Medidas de consumo hídrico e diurese.....	56
3.5.5.3 Análise da concentração de eletrólitos presentes na urina....	56
3.5.6 Análise estatística	56
3.5.7 Desenho experimental.....	56
3.6 Resultados.....	57
3.6.1 Escore neurológico de severidade	57
3.6.2 Discriminação olfatória	58
3.6.3 Labirinto em Y	60
3.6.4 Teste do campo aberto I	62
3.6.5 Teste da realocação de objetos	62
3.6.6 Teste do nado forçado	63

3.6.7 Teste do campo aberto II	64
3.6.8 Níveis de tirosina hidroxilase e dos receptores AT ₁ e AT ₂ no estriado.....	65
3.6.9 Pressão arterial sistólica.....	66
3.6.10 Ingestão hídrica e diurese	67
3.6.11 Níveis de eletrólitos (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻) presentes na urina dos camundongos tratados com MPTP e losartana	68
3.7 Discussão	70
3.8 Conclusões.....	76

4 CAPÍTULO 3: A HETEROMERIZAÇÃO DOS RECEPTORES AT₁ E A_{2A} COMO UM NOVO ALVO FARMACOLÓGICO PARA DOENÇAS DO SNC

4.1 Introdução: Oligomerização de receptores acoplados à proteína G.....	77
4.2 Oligomerização de GPCRs como alvo farmacológico.....	79
4.3 O sistema adenosinérgico na DP: foco nos GPCRs A_{2A}.....	80
4.4 Os receptores AT₁ e A_{2A} nos processos de oligomerização	81
4.5 O modelo experimental da reserpina.....	84
4.6 Objetivo geral	86
4.6.1 Objetivos específicos	86
4.7 Material e Métodos.....	86
4.7.1 Animais.....	86
4.7.2 Drogas.....	87
4.7.3 Ensaio in vitro	87
4.7.3.1 Clonagem Molecular.....	87
4.7.3.1.1 Amplificação por Reação de Cadeia Polimerase (PCR)	87
4.7.3.1.2 Digestão com enzimas de restrição	88
4.7.3.1.3 Ligação do DNA com a enzima T4 DNA ligase.....	88
4.7.3.1.4 Transformação de bactérias componentes	88
4.7.3.2 Cultivo celular.....	89
4.7.3.3 Transfecção de células por PEI.....	89
4.7.3.4 Imunocitoquímica das células HEK-293T.....	90
4.7.4 Ensaio ex vivo.....	91
4.7.4.1 Imunofluorescência.....	91
4.7.4.2 Ensaio de ligação por proximidade (PLA).....	92
4.7.4.3 Obtenção sinaptossomas totais	92
4.7.5 Teste bioquímico.....	93
4.7.5.1 Imunodeteção de proteínas: Western blotting.....	93
4.7.6 Teste comportamental.....	93

4.7.6.1 Movimentos mandibulares involuntários induzidos pela reserpina	93
4.8 Resultados.....	93
4.8.1 Receptores AT ₁ formam heterômeros com receptores A _{2A} em ensaios in vitro.....	93
4.8.2 Células co-transfectadas aumentam a mobilização de cálcio ..	96
4.8.3 Receptores AT ₁ formam heterômeros com receptores A _{2A} em ensaios ex vivo.....	98
4.8.4 Os receptores AT ₁ e A _{2A} apresentam efeito sinérgico no SNC de camundongos.....	99
4.8.5 Animais knockout para o receptor A _{2A} apresentam níveis elevados do receptor AT ₁	100
4.9 Discussão.....	102
4.10 Conclusão.....	107
5. Considerações finais.....	108
6. Referências.....	109

1 INTRODUÇÃO: O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

1.1 Uma breve contextualização histórica do sistema renina-angiotensina

A história do descobrimento do sistema renina-angiotensina tem início com “simples”, mas reveladores, experimentos realizados no laboratório de Robert Adolph Armand Tigerstedt, no Instituto Karolinska, entre 1896 e 1897. Esses experimentos foram idealizados por Richard Bright, que foi o pioneiro em fazer a ligação entre doenças renais e a hipertensão, sendo atualmente considerado o pai da nefrologia (para revisão, ver Marks; Maxwell, 1979). As descobertas realizadas por Bright e outros pesquisadores instigaram Tigerstedt a investigar se existiria uma substância oriunda dos rins capaz de influenciar os órgãos do sistema circulatório, tendo em vista a correlação entre doenças cardíacas e renais, além do corolário que surgira na época: “mensageiros químicos” cuja deficiência resultaria em doenças (MARKS; MAXWELL, 1979).

O estudo realizado por Tigerstedt e seu aluno Per Bergman testou a hipótese de que o aumento da pressão arterial (PA) ocorria em decorrência da liberação de uma substância produzida nos rins e que passaria para a circulação. Eles utilizaram extrato renal de coelhos e o fluido sobrenadante após a centrifugação era administrado em outro coelho, gerando um aumento na pressão arterial e, assim, comprovando que a hipótese estava correta. Outros experimentos realizados naquela época demonstraram que a substância era um potente agente pressor, presente no córtex renal e sangue venoso renal, mas ausente na medula e no sangue arterial. A substância encontrada também não fazia parte de nenhum componente encontrado na urina; suas características físico-químicas indicavam que se tratava de uma proteína, que, então, foi batizada pelos pesquisadores como *renina* (HINCK, 2011; MARKS; MAXWELL, 1979).

Apesar dessa grande descoberta, o conhecimento moderno sobre a renina, uma enzima proteolítica sintetizada principalmente por células justaglomerulares do córtex renal, demorou a acontecer. Apenas em 1930, após o desenvolvimento de novos métodos de medida de pressão arterial, é que ocorreu a descoberta do agente pressor direto com efeitos semelhantes ao da renina. A descoberta desse agente pressor ocorreu após estudos realizados com o modelo de “campleamento” da artéria renal de cachorros, onde rins isquêmicos eram capazes de liberar um agente vasoconstritor. Após diversos experimentos, esta substância foi isolada e

nomeada de *hipertensina* pelo grupo liderado por Eduardo Braun Menéndez, na Argentina. A conexão entre as duas moléculas continuava desconhecida, mas os estudos do grupo argentino continuaram revelando que a renina era produzida nos rins e a hipertensina era formada no plasma, e que existia uma molécula com atividade enzimática denominada hipertensinogênio, capaz de formar hipertensina por meio da renina. Por outro lado, Irvine Page e colegas da indústria Ely Lilly nos Estados Unidos da América (EUA), a primeira a sintetizar com sucesso a hipertensina, denominaram a molécula como angiotonina e, após uma conferência na Universidade de Michigan, os grupos propuseram a unificação dos nomes (angiotensina) – para revisão, ver Hinck (2011); Marks; Maxwell (1898).

A descoberta de outro componente chave do sistema renina-angiotensina, que é a enzima conversora de angiotensina (ECA), iniciou-se com a descoberta de outro peptídeo com ações proteolíticas, a calicreína (lis-bradicinina ou calidina) por Eugen Werle em 1937 (ERDOS, 2006). Logo em seguida, ocorreu a grande contribuição brasileira para a descoberta da ECA, com os pesquisadores Maurício Oscar da Rocha e Silva, Wilson Teixeira Beraldo e Gastão Rosenfeld que estudavam amostras do veneno da jararaca (ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949).

Ao estudarem o papel da histamina comumente encontrado no veneno de serpentes¹, observaram que o veneno ao ser misturado com o plasma sanguíneo gerava um agente hipotensor e uma substância espasmogênica de músculo liso, a bradicinina (*bradys* = lento; *kinesis* = movimento), e que o veneno por si era um potente fator de potencialização da bradicinina, sendo posteriormente descritos os fatores potencializadores de bradicinina, pertencentes a família dos pequenos peptídeos (FERREIRA, 2000).

As descobertas do grupo de pesquisa brasileiro originaram importantes ferramentas experimentais para que Keggs e colaboradores em 1956, descobrissem que a renina libera um decapeptídeo, a angiotensina I, e que um fator presente no plasma sanguíneo era capaz de converter a angiotensina I em angiotensina II, nomeando este fator de enzima conversora de angiotensina (ECA). Ainda, descobriu-se que a ECA e a enzima cinase II, que inativa a bradicinina, eram, na verdade, a

¹ O interesse em estudar o veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) surgiu de observações que após trabalhadores de plantações de banana sofrerem picadas das serpentes, apresentavam uma súbita queda da pressão arterial.

mesma enzima (YANG et al.,1971). Estes pesquisadores também descreveram que esta enzima era capaz de inativar a bradicinina e ativar a angiotensina II, descobrindo assim a peça do quebra-cabeça que faltava para descrever o conceito clássico do sistema renina-angiotensina, que consiste na produção do angiotensinogênio até sua conversão em angiotensina II (SKRBIC; IGIC, 2009).

1.2 O sistema renina-angiotensina nos dias de hoje

Passados quase doze décadas desde a descoberta da renina, hoje sabemos que a principal cascata catalítica do sistema (exemplificado na figura 1) é composta por uma globulina plasmática produzida no fígado, o angiotensinogênio, que é clivado pela renina (passo limitante) em angiotensina I (Ang I), que é convertida em angiotensina II (Ang II) por uma dipeptidil carboxipeptidase denominada de ECA presente nos vasos, e a Ang II pode atuar em receptores para angiotensina tipo 1 e 2 (AT₁ e AT₂), sendo essa denominada a via clássica (FYHRQUIST; SAJONMAA, 2008).

A via não clássica vem sendo descrita nos últimos anos englobando a descoberta de uma nova classe enzimática semelhante à ECA e, então, denominada enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), uma carboxipeptidase com grande afinidade à Ang II convertendo-a em angiotensina 1-7 (Ang 1-7), também podendo converter a Ang I em angiotensina 1-9 (Ang 1-9), a qual poderá ser convertida a Ang 1-7 pela ECA. De maneira semelhante, a Ang I também pode ser convertida a Ang 1-7 por endopeptidases plasmáticas. A Ang 1-7 liga-se ao receptor acoplado à proteína G denominado proto-oncogene MAS 1 (JIANG et al., 2014).

Outro eixo da via não clássica engloba os efeitos mediados pela angiotensina IV (Ang IV), sintetizada a partir da angiotensina III por aminopeptidases. A Ang IV atua nos receptores leucil-cistinil aminopeptidase ou também conhecidos como aminopeptidase de membrana regulados por insulina (IRAP), que estão colocalizados com transportadores de glicose GLUT-4 (CHAI et al., 2004).

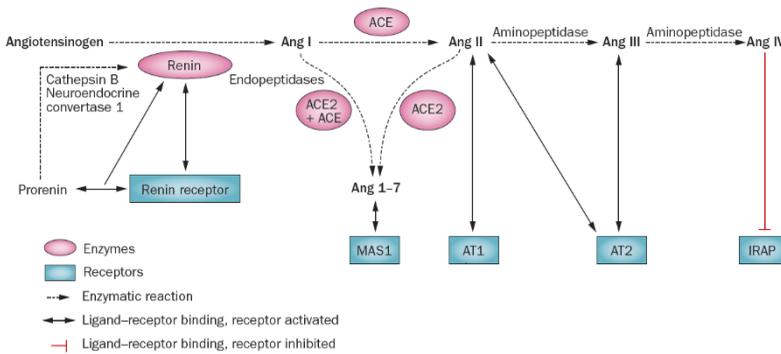


Figura 1. Componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A pró-renina pode ser ativada proteoliticamente nos rins à renina. A renina converte o angiotensinogênio em Angiotensina I (Ang. I), que pode atuar em três vias de sinalização distintas. A primeira, Ang. I, é convertida em angiotensina II (Ang. II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA), ativando receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT₁) e levando a síntese de aldosterona. A segunda, Ang. II é convertida a Angiotensina 1 – 7 (Ang. 1-7) que atuará em receptores acoplados à proteína G denominado proto-oncogene MAS 1 (MAS1). E a terceira, ocorrendo a formação de angiotensina IV que irá atuar em receptores de aminopeptidases de membrana regulados por insulina (IRAP). Figura adaptada de (ROMERO; ORIAS; WEIR, 2015).

Apesar de classicamente o sistema renina-angiotensina estar relacionado ao controle da PA e do balanço hidroeletrólítico, além do envolvimento em processos deletérios e de reparo vascular. Mais recentemente, suas atividades vêm sendo relacionadas a outras funções, exemplificadas no quadro 1, referentes aos diferentes eixos de vias de sinalização que podem ser ativados. Apesar desses avanços no conhecimento sobre o sistema renina-angiotensina, a Ang II ainda é considerada o principal mediador do sistema, no qual a elevação dos seus níveis está associada com o aumento de vasoconstrição e elevação da PA por meio de sua ligação nos receptores AT₁ presentes em vários tecidos. Porém o eixo Ang 1-7 apresentaria um efeito regulatório contrário às ações da Ang II, enquanto eixo Ang IV estaria envolvido com processos de degradação da vasopressina e da oxitocina. Os principais efeitos relacionados aos receptores do sistema renina-angiotensina estão sumarizados na Tabela 1.

Quadro 1. Efeitos dos principais receptores envolvidos nos eixos das vias de sinalização do sistema renina-angiotensina.

Receptores			
AT1* (ativação)	AT2* (ativação)	MAS1* (ativação)	IRAP* (inibição)
Efeitos			
Retenção de água e sódio	Efeitos antiproliferativos	Efeitos antifibróticos	Melhora de processos de aprendizado e memória
Vasoconstrição	Apoptose	Aumento sensibilidade do barorreflexo	Efeitos antifibróticos
Pró-inflamatório	Anti-inflamatório	Anti-inflamatório	Anti-inflamatório
Hipertensão	Vasodilatação	Vasodilatação	Vasodilatação
Secreção de aldosterona	Neuroproteção	_____	_____
Liberação de prolactina e vasopressina	Neuroregeneração	_____	_____
Aumento da ativação do sistema nervoso simpático.	_____	_____	_____

Fonte: Quadro adaptado de Romero; Orias; Weir (2015). * AT₁/ AT₂: receptores de angiotensina II tipo 1 e 2; IRAP: receptores de aminopeptidases de membrana regulados por insulina; MAS1: receptores acoplados a proteína G denominado proto-oncogene MAS 1.

1.3 Medicamentos que atuam no sistema renina-angiotensina

Com as grandes descobertas envolvendo o sistema renina-angiotensina que ocorreram nos últimos anos, surgiu uma grande variedade de alvos farmacológicos. No entanto, como o sistema está diretamente relacionado com a hipertensão, os fármacos presentes no mercado até o presente momento têm por finalidade o controle da PA, onde se destacam duas classes principais: fármacos inibidores da ECA e

fármacos antagonistas dos receptores para angiotensina II do tipo 1 (ARBs²) (FYHRQUIST; SAJONMAA, 2008).

Estes fármacos são amplamente prescritos, sendo que em 2015, de acordo com o Conselho Federal de Farmácia, o fármaco mais vendido no Brasil foi a losartana potássica, rendendo R\$515 milhões (CFF, 2015). Ainda, a losartana potássica está entre os 100 fármacos mais vendidos no mundo (MEDSCAPE, 2014). Os inibidores da ECA, como o captopril e enalapril estão entre os 5 fármacos vendidos pelo programa Farmácia Popular do Brasil³ (MS, 2014).

1.4 O sistema renina-angiotensina no sistema nervoso central

Em 1971, Detlef Ganten e colegas mudaram o conceito de que a Ang II atuava no sistema nervoso central (SNC) apenas como um agente pressor. Estes autores relataram que o sistema renina-angiotensina apresentava ações diferentes daquelas encontradas na periferia, e descreveram um efeito dipsogênico (isto é, aumentando a sede dos animais) da Ang II, além do efeito pressor (WRIGHT; HARDING, 2011). Esses relatos encorajaram diferentes grupos de pesquisa a estudar o papel do sistema renina-angiotensina no SNC, e o resultado deste esforço foi a caracterização de diversas funções fisiológicas, incluindo: liberação de vasopressina, comportamentos sexuais, influência nos sistemas autônomo e reprodutivo. Hoje em dia, sabe-se que este sistema também está relacionado à regulação do fluxo sanguíneo cerebral, ao estresse, aos transtornos de humor e ansiedade, ao consumo de álcool, a consolidação de memórias e a um possível papel na etiologia das doenças de Alzheimer e Parkinson (WRIGHT; HARDING, 2011).

Apesar da demonstração da presença do sistema renina-angiotensina no SNC, por alguns anos remanesceu a dúvida sobre a origem da Ang II, o principal efetor, uma vez que ela é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). No entanto, nas últimas duas décadas os componentes do sistema renina-angiotensina vêm sendo descritos no SNC (VON BOHLEN & HALBACH; ALBRECHT, 2006).

² ARBs – abreviação em inglês dos antagonistas dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (*angiotensin II receptor blockers*).

³ O Programa Farmácia Popular do Brasil representa uma iniciativa do Governo Federal que cumpre uma das principais diretrizes da Política Nacional de Assistência Farmacêutica. Foi implantado por meio da Lei nº 10.858, de 13 de abril de 2004, oferecendo medicamentos gratuitos ou subsidiados, para detalhes <http://portalsaude.saude.gov.br/>

O angiotensinogênio é produzido principalmente pelos astrócitos e em menor quantidade pelos neurônios. A presença de renina no SNC representa um grande questionamento na literatura, uma vez que os seus níveis de expressão, principalmente em neurônios e células da glia, não representam a quantidade de Ang II formada. Uma das hipóteses para os baixos níveis de renina seria a presença dos receptores de pró-renina/renina, amplamente expressos em neurônios dopaminérgicos e células da glia. Ao serem ativados, estes receptores levariam à conversão da pró-renina em renina e aumentariam os níveis de renina entre 5 e 10 vezes (GARRIDO-GIL et al., 2013). Em situações patológicas, essa conversão elevaria entre 20 e 200 vezes os níveis de renina. A conversão em angiotensina II ocorre predominantemente pela via clássica, como descrito para o sistema nervoso periférico anteriormente, apesar de também ocorrer por meio da catepsina G ou tonina, bem como a formação de Ang III e Ang IV, também pela via clássica (VON BOHLEN UND HALBACH; ALBRECHT, 2006; WRIGHT; HARDING, 2013).

Os receptores de Ang II também são expressos no SNC. Os receptores AT₁ são amplamente expressos em praticamente todas as regiões cerebrais, principalmente em neurônios dopaminérgicos (VON BOHLEN & HALBACH; ALBRECHT, 2006). O receptor AT₁ está acoplado à proteína G e apresenta sete domínios transmembrana. Sua principal via de sinalização consiste na ativação da proteína Gq, ativando a fosfolipase C, levando a um aumento intracelular de inositol trifosfato (IP3) e à geração de diacilglicerol (DAG) e subsequente aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular e atividade da proteína quinase C (PKC). Os receptores AT₁ estão localizados predominantemente na pré-sinapse e estes podem estar envolvidos na regulação da liberação de diferentes neurotransmissores (VILLAR-CHEDA et al., 2010). Em culturas celulares, já foi demonstrado que esses receptores são capazes de inibir canais de potássio dependentes de voltagem, além de exercerem um papel modulatório sobre os canais de Ca²⁺. Os receptores AT₁, quando ativados, tornam-se os principais ativadores do complexo NADPH oxidase (nicotinamida adenina fosfato [NADP] oxidase) no SNC, sendo que esse complexo pode ser ativado de diferentes formas, como PKC e cinases de adesão (FAK). Esse complexo enzimático, após ativado, torna-se a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) no SNC, principalmente em neurônios dopaminérgicos (VON BOHLEN & HALBACH; ALBRECHT, 2006).

Os receptores AT₂ também são receptores acoplados à proteína G, no entanto, a sua principal via de sinalização ainda não foi determinada. Sua ativação pode envolver a ativação de proteínas G_{ai2/ai3}

ou, ainda, estimular a atividade de canais de potássio e inibir proteínas quinases ativadas por mitógenos e proteína fosfatase A2 via $G_{\alpha i}$, podendo, também, ativar a óxido nítrico sintase neuronal, levando à formação de óxido nítrico (NO).

Os receptores AT_2 , ao contrário dos receptores AT_1 , não são amplamente expressos no SNC, mas é possível observar sua presença em áreas relacionadas ao aprendizado (como o hipocampo) e ao controle motor (como o corpo estriado). De maneira interessante, a expressão dos receptores AT_2 encontra-se aumentada após a ativação dos receptores AT_1 , estabelecendo, assim, o seu principal papel, que seria o de frear ou de impedir ações exacerbadas mediadas pelos receptores AT_1 (VON BOHLEN & HALBACH; ALBRECHT, 2006).

Santos e colaboradores, em 2003, foram os primeiros a descrever que a Ang 1-7 era capaz de ligar-se aos receptores MAS1, e, portanto, estabeleceram a presença do eixo ACE2-Ang 1-7-MAS1. Os receptores MAS1, que são ativados pela Ang 1-7, também são receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana, e também são expressos no SNC, principalmente no córtex pré-frontal, córtex cerebral, hipocampo e amígdala (SANTOS et al., 2003). De maneira semelhante aos receptores AT_2 , os receptores MAS1 apresentam um papel oposto aos receptores AT_1 , embora a sua via de sinalização ainda não esteja bem caracterizada. Entretanto, é possível observar que a ativação do sistema pode levar à formação de NO, além de levar à fosforilação de algumas proteínas, como as quinases relacionadas ao sinal extracelular (ERK) I e II e ser capaz de impedir a ativação do complexo NADPH ativado pela Ang II (LAZARONI et al., 2012).

O receptor de Ang IV, o IRAP (aminopeptidases de membrana regulados por insulina), também denominado por alguns autores como receptores de Ang IV (AT_4), foi clonado pela primeira vez em 1995 por Keller e colaboradores. Geralmente, esses receptores estão associados a transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4), e essa associação faz com que os IRAP tenham um papel em regular a captação de glicose para o interior da célula, além de participarem do transporte das vesículas do GLUT4 para a membrana celular (CHAI et al., 2004).

O complexo IRAP/GLUT4 é expresso no SNC, principalmente no hipocampo, facilitando a captação de glicose para o interior da célula. Ademais, os IRAP são capazes de hidrolisar uma série de compostos, como a somatostatina, dinorfinas A, vasopressina, entre outros. Apesar da Ang IV ser um antagonista dos IRAP, ela apresenta um efeito dose-resposta dual. Pode ativar algumas vias de sinalização, como a fosforilação de proteínas quinases relacionadas ao sinal extracelular

(ERK) I e II, e também levar à liberação de Ca^{2+} reticular por meio do NO endotelial e ativar fosfatidilinositol 3-quinases (IP3K). Porém essas vias ainda precisam ser melhor investigadas no SNC (CHAI et al., 2004).

2 CAPÍTULO 1: O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E O ENVELHECIMENTO

2.1 Introdução: Envelhecimento populacional

O envelhecimento populacional, isto é, o crescimento da população com 60 anos ou mais, é um fenômeno mundial segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos e antigos, mas, de acordo com o último censo divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2008, 8,6% da população brasileira tinha 60 anos de idade ou mais, representando aproximadamente 15 milhões de habitantes. Nos próximos 20 anos, ainda segundo o IBGE, o número de idosos no Brasil poderá ultrapassar a marca dos 30 milhões, e deverá representar aproximadamente 13% da população brasileira.

A razão e os mecanismos do envelhecimento são temas de investigação de diferentes áreas da ciência, que buscam alternativas de como aumentar a longevidade ou promover um envelhecimento mais saudável. O envelhecimento é caracterizado como um processo natural pelo qual ocorre um declínio funcional dependente do tempo e que afeta a maioria dos seres vivos (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).

O conhecimento sobre as bases celulares e moleculares está em constante expansão, sendo que muitos grupos de pesquisa envolvidos com o tema consideram que o acúmulo de danos celulares causados ao longo do tempo representa o principal fator do envelhecimento (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Esses danos podem ser causados por fatores exógenos (contato com agentes químicos e radiação ultravioleta e infravermelha) e fatores endógenos (produção de EROs, reações espontâneas e erros de replicação), que podem levar à disfunção mitocondrial, à alterações da comunicação celular, à exaustão das células-tronco, à desregulação da sensibilidade aos nutrientes, à alterações epigenéticas, à instabilidade genômica, entre outros, quando as respostas compensatórias frente ao dano não conseguem reestabelecer a homeostase (DEFAZIO et al., 2013; JONES, 2015; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; MOSKALEV et al., 2013).

O complexo processo biológico do envelhecimento causa um declínio de diversas funções fisiológicas, que leva a mortalidade em decorrência do tempo (KIRKLAND, 2016). Muitas dessas teorias tentam

explicar o processo do envelhecimento, mas nenhuma apresenta um consenso universal (LENART; KREJCI, 2016). Por outro lado, é consenso que o envelhecimento é um fator de risco para uma variedade de doenças crônicas, como: diabetes tipo 2, aterosclerose, diferentes tipos de câncer, artrite, disfunções renais, cegueira, demências e doenças de Alzheimer e de Parkinson (HEDDEN; GABRIELI, 2004).

Diversos estudos que demonstram muitas doenças do SNC ocorrem devido a morte neuronal fisiológica, como observado com o sistema dopaminérgico. Por exemplo, têm sido descritas perdas de neurônios dopaminérgicos em decorrência da idade, além da disfunção nos transportadores e receptores para dopamina que estão envolvidos com o planejamento, iniciação e controle dos movimentos voluntários (DARBIN, 2012). Este declínio dopaminérgico também afeta outras áreas cerebrais, sendo este relacionado com diferentes prejuízos e doenças, como distúrbios emocionais, depressão, ansiedade e transtornos de aprendizado e memória (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015).

Além disso, o envelhecimento causa o declínio de outros sistemas de neurotransmissão e funções (KATSUMATA et al., 2012). São verificados prejuízos significativos com o envelhecimento na visão e audição, apetite, discriminação olfatória, memórias de curto prazo e dificuldade em encontrar expressões e palavras adequadas (LIN et al., 2011). Os sintomas também podem se estender a lentidão no pensamento crítico e/ou funções executivas. Embora a base neurobiológica para estes efeitos não seja bem compreendida, os estudos realizados em cérebros de uma variedade de espécies de mamíferos, incluindo seres humanos, concluem que a redução no número de conexões sinápticas entre os neurônios é a correlação mais consistente entre o envelhecimento e o declínio cognitivo (BORDNER et al., 2011; COVINSKY et al., 2014; DICKSON et al., 1995; VANGUILDER et al., 2011).

2.2 O envelhecimento e o sistema renina-angiotensina

O envelhecimento é caracterizado por um declínio na integridade fisiológica, levando a um prejuízo funcional e aumentando a vulnerabilidade para a morte celular, como destacado anteriormente. Essa deterioração é o principal fator de risco para o desenvolvimento das principais doenças humanas, tais como: doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e as doenças neurodegenerativas (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013).

Apesar de não existir um consenso sobre o processo do envelhecimento, baseados nos estudos existentes até o momento, este

processo engloba uma variedade de alterações, gerando uma diversidade de alvos terapêuticos. Neste sentido, destacamos o potencial terapêutico do sistema renina-angiotensina, que apesar de existirem poucos trabalhos⁴ relacionando o envelhecimento e doenças associadas ao envelhecimento, ele apresenta uma característica polivalente, onde a sua modulação seria capaz de levar a diferentes efeitos benéficos no SNC, como descrito detalhadamente em seguida.

O sistema renina-angiotensina parece estar intimamente ligado ao processo de envelhecimento, uma vez que o sistema seria capaz de sustentar e/ou exacerbar a formação de EROs em decorrência do processo de envelhecimento por meio da ativação do complexo NADPH oxidase pela Ang II via receptores AT₁. Esse processo leva a produção de ânions superóxidos (O²⁻), os quais, ao final da reação, aumentariam a produção de fatores de transcrição pró-inflamatórios sensíveis à oxirredução, como os fatores de transcrição NF-κB e Ets-1, que promovem e/ou potencializam a cascata inflamatória, acelerando o início ou o progresso da senescência celular (MARVAR et al., 2011; VILLAR-CHEDA et al., 2014).

Benigni e colaboradores demonstraram que 85% dos camundongos deficientes para o receptor AT₁ apresentaram aumento da longevidade em relação ao grupo controle, sendo este efeito relacionado à preservação do número de mitocôndrias ao longo do envelhecimento (BENIGNI et al., 2009). Nesse sentido, Nidia Basso e colaboradores também demonstraram que o tratamento crônico com um inibidor da ECA (enalapril) ou um antagonista do receptor AT₁ (losartana) foi capaz de aumentar a longevidade de ratos Wistar em aproximadamente 160 dias (BASSO et al., 2007).

Os principais distúrbios que vêm aumentando nos últimos anos em decorrência do aumento da longevidade são o declínio cognitivo⁵ e a demência, que comumente estão interligados, levando a

⁴ Ao cruzarmos os termos envelhecimento e sistema renina-angiotensina são encontrados 701 trabalhos na base de dados do PubMed.gov, consulta realizada em 06 de março de 2016.

⁵ O declínio cognitivo é um termo amplo que engloba diferentes processos mentais, tais como: percepção, pensamento, memória, movimento, atenção, emoções, a capacidade de entender as intenções e os pensamentos de outras pessoas, tomada de decisão e autoconsciência.

uma redução da qualidade de vida do indivíduo idoso (BORDNER et al., 2011).

O sistema renina-angiotensina é capaz de modular múltiplas funções no SNC, incluindo os processos de aprendizado e memória. O sistema renina-angiotensina pode contribuir diretamente nesses processos, pois suas atividades estão relacionadas ao crescimento, à diferenciação e à migração celular, principalmente mediadas pelos receptores AT₂ (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; KERR et al., 2005).

A administração de Ang II é capaz de impedir a consolidação de memórias aversivas em ratos Wistar quando administrada diretamente na região CA1 do hipocampo, onde esse mecanismo englobaria a ação da Ang II sobre os receptores AT₂ (KERR et al., 2005).

Por outro lado, foi demonstrado que a angiotensina 1-7 é capaz de influenciar a formação da potencialização de longo prazo (LTP)⁶ em diferentes estruturas do sistema límbico, que apresentam diferentes funções nos processos de aprendizado e memória, por meio de receptores MAS1 em camundongos (HELLNER et al., 2005). Nesse sentido, Lazaroni e colaboradores demonstraram que a ausência ou o bloqueio dos receptores MAS1 na região CA1 do hipocampo prejudicam a tarefa do reconhecimento de objetos, e que o bloqueio dos receptores AT₁, mas não dos receptores AT₂, é capaz de reverter o prejuízo apresentado pelos animais knockouts para MAS1 nesse teste (LAZARONI et al., 2012). Ainda, um estudo de coorte demonstrou que o tratamento com antagonistas do receptor AT₁ é capaz de reduzir a incidência de casos de demência, incluindo Alzheimer, em comparação com inibidores da ECA e outros fármacos com efeitos cardiovasculares (LI et al., 2010).

2.3 Justificativa e hipótese do trabalho

Trabalhos prévios têm demonstrado que o bloqueio dos receptores para angiotensina II do tipo 1 (AT₁) é capaz de aumentar a longevidade de roedores e melhorar os processos de aprendizado e memória em animais adultos. Entretanto, até o presente momento não existem trabalhos na literatura investigando os possíveis benefícios do tratamento com antagonistas dos receptores AT₁ sobre as alterações

⁶ Potenciação de longa duração, do inglês *'long-term potentiation'* refere-se à potencialização duradoura na eficiência sináptica frente a um estímulo e tem sido apontado como um marcador bioquímico dos processos de aprendizado e memória.

comportamentais associadas ao envelhecimento. Sendo assim, hipotetizamos que o tratamento com losartana, um antagonista dos receptores para angiotensina II do tipo 1, seja capaz de reverter as alterações comportamentais relacionadas com o envelhecimento em camundongos.

2.4 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com losartana, um antagonista dos receptores para angiotensina II do tipo 1, sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas ao processo de envelhecimento em camundongos.

2.4.1 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do tratamento durante 22 dias com a losartana pela via intraperitoneal (i.p.) em camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade sobre:

- O estado neurológico geral dos animais;
- Os comportamentos relacionados à olfação, anedonia, aprendizado e memória, atividade locomotora espontânea e coordenação motora;
- O peso corporal e a pressão arterial sistêmica dos animais;
- Os níveis dos receptores para angiotensina II do tipo 1 e 2 no córtex pré-frontal.

2.5 Material e Métodos

2.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 de 3 e 13 meses de idade, da colônia de expansão do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas retangulares (49 x 34 x 16 cm). Os animais foram mantidos em gabinetes climatizados (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos desta tese estão de acordo com os padrões éticos legais e foram aprovados pela Comissão de Ética para o uso de animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo número PP0830/2013.

2.5.2 Drogas

A losartana potássica (Abcam®), um antagonista dos receptores para angiotensina II do tipo 1, foi dissolvida em solução fosfato salino pH 7,4 (PBS), o PBS foi utilizado como solução controle/veículo. A losartana⁷ foi administrada pela via i.p. durante 22 dias na dose de 50 mg/kg sempre ao final do ciclo claro (18:00 h), objetivando evitar o viés do efeito agudo do fármaco. A seleção da dose de losartana baseou-se em um estudo piloto e trabalhos prévios publicados na literatura (BASSO et al., 2007; RONGEN et al., 1998).

2.5.3 Testes comportamentais

2.5.3.1 Avaliação do Escore Neurológico de Severidade

Sete dias após o início da administração de losartana (50 mg/kg), os camundongos foram submetidos ao Escore Neurológico de Severidade (ENS) que pode ser visualizado na Figura 2. O teste consiste em uma escala composta de tarefas para medir o estado neurológico geral de roedores, como descrito primeiramente por FLIERL et al. (2009) e padronizado em nosso laboratório por SCHWARZBOLD et al. (2010). Os animais foram avaliados no ENS através dos parâmetros apresentados na Tabela 1. O animal que apresentou falha na execução de algum desses parâmetros recebeu o valor de um (01) adicionado ao escore total. Sendo assim, valores mais altos no ENS indicam um maior comprometimento neurológico do animal (SCHWARZBOLD et al., 2010).

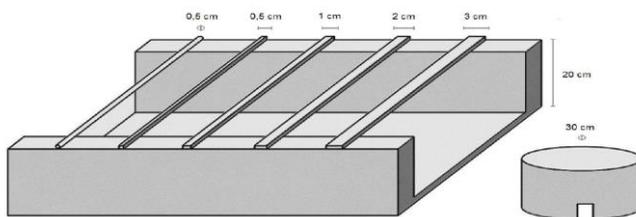


Figura 2: Aparato utilizado para avaliação do Escore Neurológico de Severidade em camundongos (SCHWARZBOLD et al., 2010).

⁷ Ao decorrer do texto, utilizaremos o termo losartana ao invés de utilizarmos seu nome composto losartana potássica.

Tabela 2. Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de Severidade (ENS)

Testes	Capacidade/Incapacidade	
Presença de paresia	0	1
Inabilidade em andar em linha reta	0	1
Perda do comportamento exploratório	0	1
Falha em sair do círculo (até 3 min)	0	1
Inabilidade em andar na trave de 3 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade em andar na trave de 2 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade em andar na trave de 1 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade em se equilibrar na trave 0,7 cm (até 10 s)	0	1
Inabilidade em se equilibrar na trave redonda (até 10 s, 3 tentativas)	0	1
Perda do reflexo de sobressalto	0	1
Escore máximo		10

2.5.3.2 Teste da discriminação olfatória

O teste da discriminação olfatória foi realizado oito (8) dias após o início da administração de losartana (50 mg/kg, i.p.). O teste, previamente padronizado em nosso laboratório (PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2005), consistiu em colocar cada camundongo por 5 minutos em uma caixa dividida em dois compartimentos idênticos (30 cm x 30 cm x 20 cm), separados por uma porta aberta. Nesta caixa, os animais podiam escolher livremente entre o compartimento que recebeu a maravalha limpa, denominado ambiente não-familiar, e o outro compartimento que recebeu a maravalha impregnada com seu próprio odor, denominado ambiente familiar. Para a impregnação do próprio odor, os animais foram isolados previamente por 24 horas antes do teste. O tempo gasto pelos animais em ambos os compartimentos (familiar e não familiar) foi mensurado. O comportamento natural dos animais adultos é discriminar entre os ambientes familiar e não familiar, dependendo mais tempo no ambiente familiar, indicando uma preferência pelo ambiente com o seu próprio odor (PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2005).

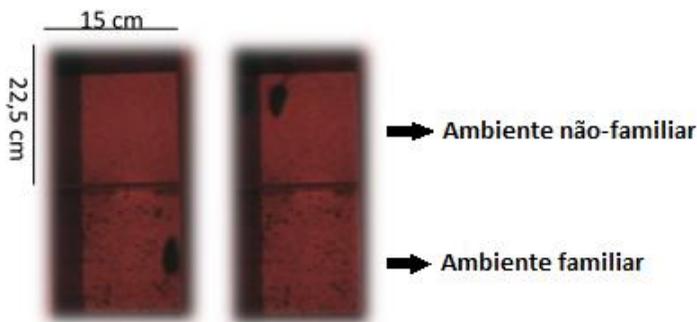


Figura 3. Foto representativa do aparato de discriminação olfatória. Fonte: acervo pessoal do autor.

2.5.3.3 Teste do labirinto em Y

Para avaliarmos o comportamento de alternâncias espontâneas e atividade exploratória foi realizado o teste do labirinto em Y doze (12) dias após o início da administração de losartana (50 mg/kg, i.p.). O teste foi realizado num labirinto em formato de Y contendo três (3) braços idênticos (20 cm x 5 cm x 20), ilustrado na Figura 4 (SATOH et al., 2007). Durante a execução do teste, os animais foram colocados no centro do aparato e podiam explorar livremente o labirinto em Y durante oito (8) minutos. O número de alternâncias corretas (alternar entre os braços do labirinto, sem repetir os braços anteriormente explorados) e o número de entradas nos braços do labirinto foram mensurados. As alternâncias corretas foram expressas em percentual, referindo-se a uma razão entre o número de alternâncias corretas dividido pelo número total de entradas subtraído 2 x 100 (KING et al., 1999).

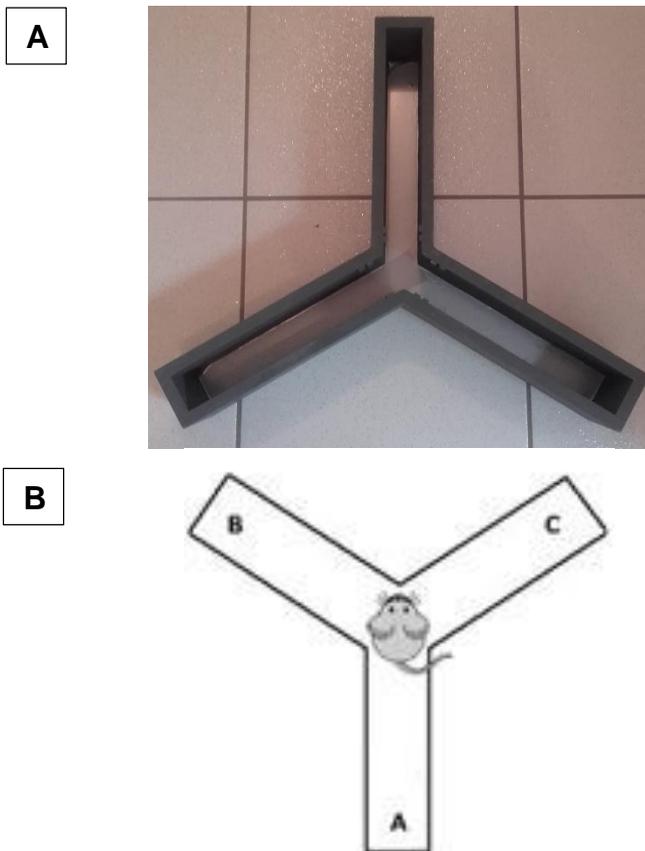


Figura 4. (A) Labirinto em Y no qual as alternâncias espontâneas dos animais foram avaliadas durante 8 minutos. (B) Representação esquemática da identificação dos braços do labirinto em Y. Fonte: acervo pessoal do autor.

2.5.3.4 Teste do campo aberto

A atividade locomotora espontânea dos animais foi avaliada no teste do campo aberto, treze (13) e vinte (20) dias após o início da administração de losartana (50 mg/kg, i.p.), usando a metodologia descrita previamente (PREDIGER et al., 2008a). Os camundongos foram colocados individualmente no centro da arena de acrílico (40 cm x 40 cm, chão pintado na cor cinza) e exploraram livremente o campo aberto por um período de 5 ou 60 minutos, conforme detalhado na seção de resultados (Figura 5). O parâmetro de distância total percorrida foi avaliado utilizando o software ANYmaze® (Stoelting, EUA). Após o

final do teste de cada animal, o aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% e seco com papel toalha para evitar a presença de estímulos olfatórios. O experimento foi realizado em condições de baixa luminosidade (12 lux).

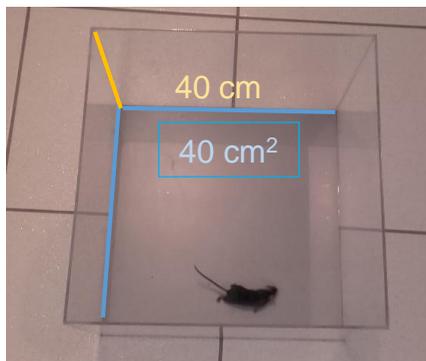


Figura 5. Figura ilustrativa do aparato do campo aberto no qual a locomoção espontânea dos animais foi avaliada durante 5 ou 60 minutos. Fonte: acervo pessoal do autor.

2.5.3.5 Teste de realocação de objetos

O aparato do campo aberto foi utilizado para a realização do teste da realocação de objetos realizado quatorze (14) dias após o início da administração de losartana (50 mg/kg, i.p.). Como descrito anteriormente, o aparato utilizado consiste numa arena com paredes de acrílico transparente (40 cm x 40 cm, chão pintado na cor cinza). Os objetos utilizados foram dois retângulos plásticos idênticos (3 cm x 4,5 cm x 4,5 cm) que foram colados no chão do campo aberto em lados opostos de maneira equidistante 7 cm das paredes do aparato. O protocolo utilizado consistiu em uma sessão de treino com duração de 3 minutos, na qual os animais puderam explorar livremente os dois objetos idênticos, sendo registrados os tempos de investigação de cada um dos objetos. Após a sessão de treino, os animais retornavam a sua caixa moradia e aguardavam 90 minutos até a sessão de teste. Durante o teste, um dos objetos foi alterado de lugar, enquanto o outro permaneceu na mesma posição no campo aberto. Foram registrados novamente os tempos de investigação de cada um dos objetos durante 3 minutos. Os atos de cheirar e tocar os objetos foram considerados como comportamentos de exploração dos objetos. Os tempos de investigação dos objetos foram utilizados para o cálculo do índice de localização de objetos [índice: $t(s)$]

investigação do objeto realocado $\times 100 / t(s)$ de investigação do objeto realocado + $t(s)$ de investigação do objeto não realocado], o qual foi utilizado como parâmetro de memória (ASSINI; DUZZIONI; TAKAHASHI, 2009).

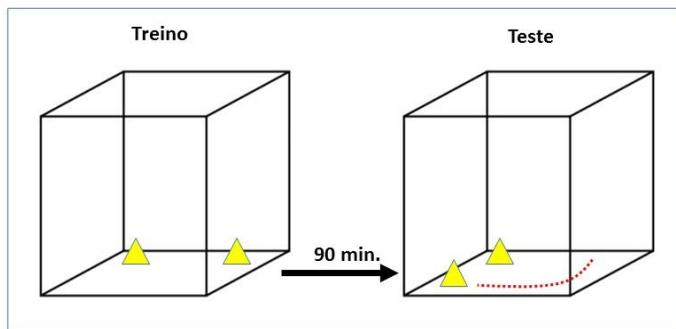


Figura 6. Representação esquemática do teste da realocação de objetos.

2.5.3.6 Teste do esguicho (do inglês splash test)

O teste foi realizado com iluminação ambiente de baixa intensidade (12 lux) dezesseis (16) dias após o início da administração de losartana (50 mg/kg, i.p.). O procedimento consistiu em esguichar por duas vezes uma solução de sacarose 10% sobre o dorso dos animais. Em seguida, os animais foram colocados sob um funil de vidro transparente para a avaliação comportamental. Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose se adere a pelagem dos camundongos e estes iniciam o comportamento de autolimpeza (do inglês *grooming*). Após a aplicação da solução de sacarose, os animais foram observados por um período de 15 minutos e registrou-se o tempo de autolimpeza direcionado ao dorso como uma medida de autocuidado e comportamento motivacional. Após o fim de cada teste, a caixa de acrílico foi cuidadosamente limpa com uma solução de etanol 10% e seca com papel toalha. O teste avalia uma forma de comportamento motivacional considerado semelhante com alguns sintomas de anedonia e apatia (WILLNER, 2005).

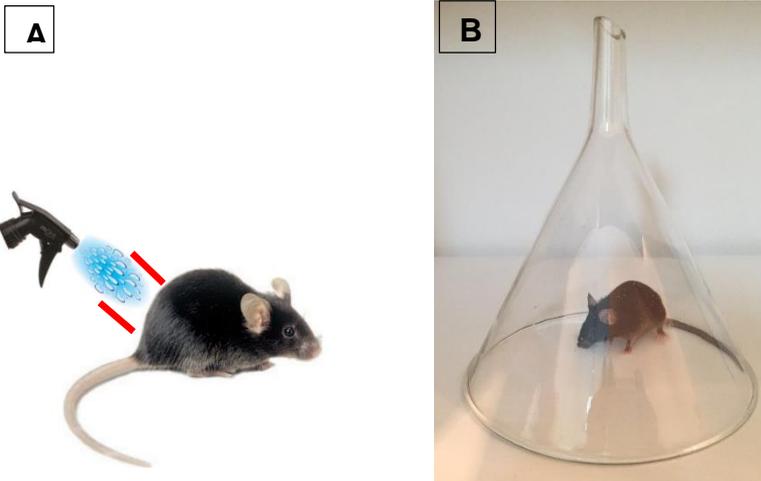


Figura 7. Representação esquemática do teste do esguicho. (A) As linhas vermelhas indicam a região dorsal dos animais onde foi realizado o esguicho da solução de sacarose 10%. (B) Aparato utilizado para a análise do comportamento de *grooming* durante 15 minutos.

2.5.3.7 Teste do rotarod

O sistema do rotarod (Rotamex-V-EE/85), controlado por sistema computacional (Columbus *Instruments Computer-Counter Interface*; Ohio, EUA), foi utilizado para a avaliação da coordenação motora e o equilíbrio dos camundongos antes (medida basal) e 1 - 4 semanas após o início do tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p.). Utilizou-se a versão em aceleração do rotarod, onde os animais foram colocados sobre um cilindro em rotação, com velocidade inicial de 5 rotações por minuto (RPM) e aceleração de 0,1 revolução/s, sendo a latência para queda (em segundos) registrada numa única sessão de teste (SHIOTSUKI et al., 2010).



Figura 8. Aparato do rotarod utilizado para a avaliação da coordenação motora e equilíbrio dos animais. Fonte: acervo pessoal do autor.

2.5.4 Medida da pressão arterial

Considerando que a losartana representa um fármaco hipotensor, a pressão arterial dos animais foi avaliada empregando-se a técnica de pletismografia de cauda, após 22 dias de tratamento. Esta consiste num contensor de acrílico no qual os animais foram imobilizados, um manguito (*tail cuff*) que foi colocado na cauda do animal, um transdutor de pressão também alocado na cauda do animal e um sistema de aquisição de dados (PowerLab, AD Instruments, Austrália). Primeiramente, foi realizada uma sessão treino (Dia 1) na qual cada animal teve o seu primeiro contato com o aparelho. Nesta etapa, os animais ficaram acondicionados em uma sala por 30 minutos antes do início da sessão, mantida sob temperatura controlada (30 °C). Para o início do treino, cada animal foi colocado no contensor de acrílico localizado sobre uma manta aquecida. O manguito foi alocado na cauda do animal e foram realizadas 5 medidas ao longo de 5 minutos. Após essa sessão treino, os animais foram colocados novamente em suas caixas moradia e acondicionados no biotério. No dia seguinte (Dia 2), sob as mesmas condições de aclimação, os animais foram acondicionados nos contensores e tiveram suas medidas da pressão arterial sistólica (PAS, em mm Hg) coletadas (5 medidas em 5 minutos). Esta etapa foi denominada de aferição controle. Os dados captados (LabChart versão 7.0, AD Instruments, Austrália)

foram plotados em planilhas e considerados como a média de 5 medidas por animal.

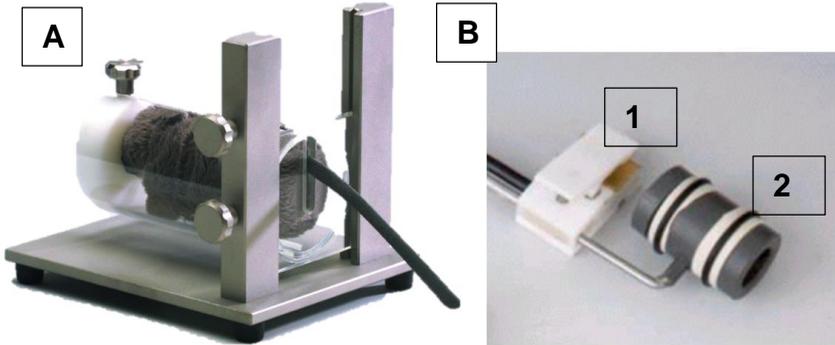


Figura 9. Imagens representativas da técnica de plethysmografia de cauda utilizada para a mensuração da pressão arterial dos animais. (A) Contenedor de acrílico utilizado para a imobilização dos animais. (B1) Manguito (*tail cuff*) colocado na cauda do animal e (B2) um transdutor de pressão. Fonte: Bioseb.com.

2.5.5 Teste bioquímico

2.5.5.1 Imunodeteção de proteínas: Western blotting

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical vinte e dois (22) dias após o início da administração de losartana (50 mg/kg, i.p.), o córtex pré-frontal foi dissecado e homogeneizado mecanicamente (1:10 m:v) em tampão Tris-base 50 mM, EDTA 1 mM, 100 mM NaF, Na₂VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10%, pH 7, e coquetel inibidor de proteases (PMSF, leupeptina, aprotinina, pepstatina). Os lisados foram centrifugados (10.000 g, 20 minutos, 4° C) e os sobrenadantes foram diluídos 2:1 (v:v) em tampão Tris 100 mM, EDTA 4 mM, SDS 8%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 8%, pH 6,8. As amostras (20 µg de proteína) foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida (12%), sendo posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram bloqueadas (1 h) com leite desnatado 5% em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5), e, posteriormente, incubadas por 12 h (4°C) com anticorpos primários anti- receptor AT₁ (ab18801, 1:1000) e AT₂ (ab19134, 1:1000) (ABCAM, Cambridge, Reino Unido) diluídos em TBS-T. Após as incubações com os anticorpos primários, as membranas

foram lavadas com TBS-T (3 x 10 min) e incubadas por 2 h em temperatura ambiente com os anticorpos secundários específicos (ligados à peroxidase). Para detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas três vezes (10 min) com TBS-T, e as bandas imunorreativas foram visualizadas por meio de kit de aumento de quimiluminescência e o sinal foi fotografado por um sistema de captação de imagens (ChemiDoc MP – Bio-Rad®). A densidade óptica das bandas foi quantificada utilizando a plataforma do NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA) e os valores expressos como unidades arbitrárias em relação a β -actina.

2.5.6 Análise estatística

Utilizou-se a análise estatística de variância (ANOVA) fatorial seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e o nível de significância aceito como indicativo de diferença entre os grupos foi de $P \leq 0.05$. Para o teste do rotarod utilizou-se a análise de variância com medidas repetidas. No teste do escore neurológico de severidade, os parâmetros avaliados foram representados como medianas \pm intervalo interquartil, onde a comparação das medianas foi realizada através do teste de Mann-Whitney U. O teste “t” de *student* foi utilizado para determinar se o percentual de tempo gasto pelo animal explorando o objeto realocado diferia significativamente de um valor teórico de 50%. Todas as análises foram realizadas com o software Statistica 7®. Todos os gráficos contidos nessa tese foram produzidos com a utilização do software GraphPad Prism 5®.

2.5.7 Desenho experimental

O desenho experimental ilustrado na figura 10, foi utilizado para testar os efeitos do tratamento crônico com losartana 50 mg/kg sobre o processo de envelhecimento em camundongos.

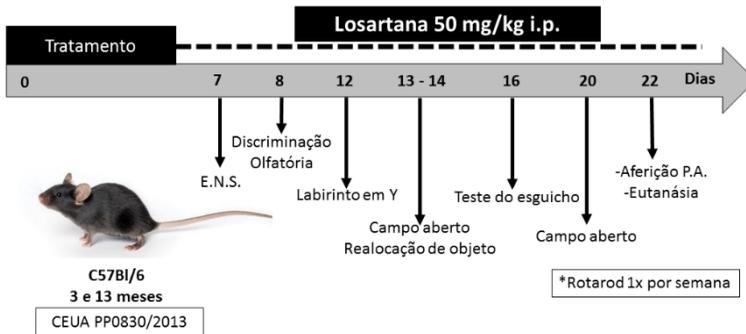


Figura 10. Primeiro protocolo experimental. Camundongos C57Bl/6 machos com 3 e 13 meses de idade foram submetidos a administração de losartana (50 mg/kg, i.p.) durante 22 dias. Durante o período do 7º até o 22º dia de tratamento, os animais foram avaliados nos testes comportamentais do escore neurológico de severidade (ENS), discriminação olfatória, labirinto em Y, campo aberto, realocação de objeto, teste do esguicho, rotarod e aferição da pressão arterial sistólica (PA). Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e o córtex pré-frontal foi dissecado e congelado para posterior análise dos níveis de proteínas de interesse através da técnica da imunodeteção de proteínas.

2.6 Resultados

2.6.1 Escore neurológico de severidade

A Figura 11 ilustra o desempenho dos animais ao serem avaliados no ENS, sete (7) dias após o início do tratamento com a losartana. Os animais com 13 meses de idade tratados com veículo apresentaram uma maior pontuação na escala quando comparados ao grupo 3 meses/veículo [Mann-Whitney $U = 6$ ($P \leq 0,05$)], sugerindo que o fator envelhecimento é capaz de promover um comprometimento neurológico nos camundongos. Entretanto, o teste de Mann Whitney revelou ausência de diferenças significativas entre os animais 13 meses de idade tratados com losartana em relação ao grupo 3 meses/losartana e em relação ao grupo 13 meses de idade/veículo, demonstrando que a losartana foi capaz de atenuar os prejuízos neurológicos relacionados ao envelhecimento.

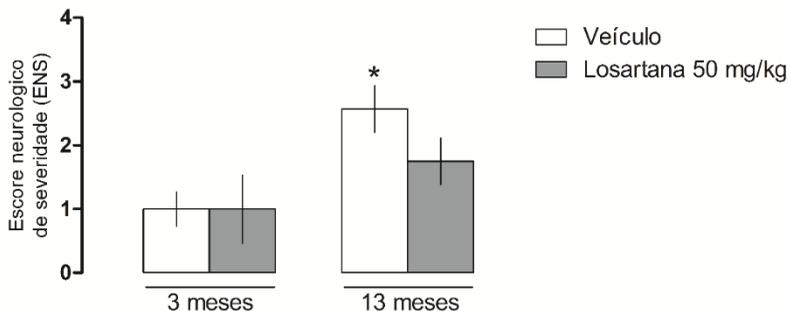


Figura 11. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre o estado neurológico geral de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliado no teste do Escore Neurológico de Severidade realizado sete (7) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados estão representados pela mediana e intervalo interquartil. Um maior escore indica um maior comprometimento neurológico, até o máximo de 10 pontos. * $P < 0,05$ comparado ao grupo 3 meses/veículo (teste de Mann-Whitney U) ($n = 8$ /grupo).

2.6.2 Teste de discriminação olfatória

Sete dias após o início do tratamento com losartana os animais foram avaliados no teste da discriminação olfatória para investigar possíveis prejuízos olfatórios relacionados ao envelhecimento. O controle locomotor do teste, representado pelo número de cruzamentos entre os compartimentos familiar e não familiar, indica que os fatores tratamento e idade não influenciaram a atividade locomotora espontânea dos animais, não havendo diferenças significativas entre os grupos [$F_{(1,36)} = 0,12$, ($P > 0,05$)] (Figura 12A). Como observado na Figura 12B, o teste “t” de student (vs. 50%) demonstra que todos os grupos experimentais foram capazes discriminar entre os ambientes familiar e não familiar, ou seja, os animais permaneceram mais tempo no ambiente familiar.

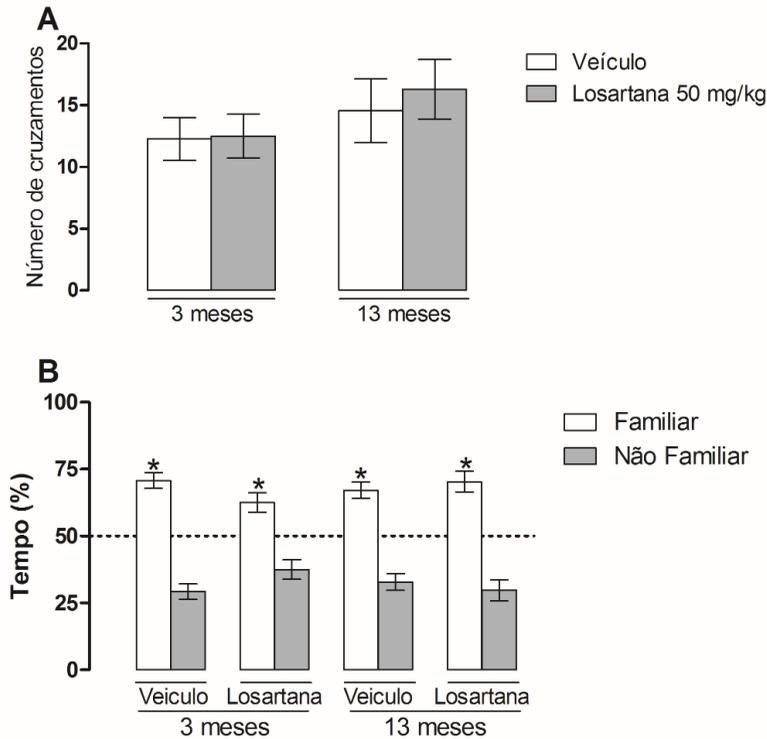


Figura 12. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a função olfatória de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste da discriminação olfatória realizado oito (8) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. (A) As barras verticais representam o número total de cruzamentos entre o ambiente familiar e não familiar. (B) As barras verticais representam o percentual do tempo de permanência dos camundongos no ambiente familiar (barras brancas) e não familiar (barras cinzas). * $P < 0,05$ comparado ao percentual do tempo despendido no ambiente não familiar (Teste “t” de student) ($n = 9-11/\text{grupo}$).

2.6.3 Teste do labirinto em Y

Doze dias após o início do tratamento com losartana os animais foram avaliados no teste do labirinto em Y, para investigar possíveis prejuízos na memória de trabalho. A ANOVA fatorial indicou ausência de diferenças significativas entre os grupos [$F_{(1,33)} = 0,77$ ($P \geq 0,05$)] no

número total de entradas nos braços (Figura 13A), utilizado como um parâmetro locomotor no teste. Com relação ao percentual de alternâncias corretas, a ANOVA fatorial indicou um efeito significativo do fator idade [$F_{(1,33)}=18,76$, ($P\leq 0,05$)]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma redução no número de alternâncias corretas nos animais com 13 meses em relação aos jovens (Figura 13B). Além disso, foi observado um efeito significativo na interação entre os fatores tratamento e idade [$F_{(1,41)}=4,98$ ($P\leq 0,05$)] e a análise *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma redução no número de alternâncias corretas no grupo 13 meses/veículo e que o tratamento com losartana foi capaz de aumentar o número de alternâncias corretas nos animais com 13 meses de idade (Figura 13B).

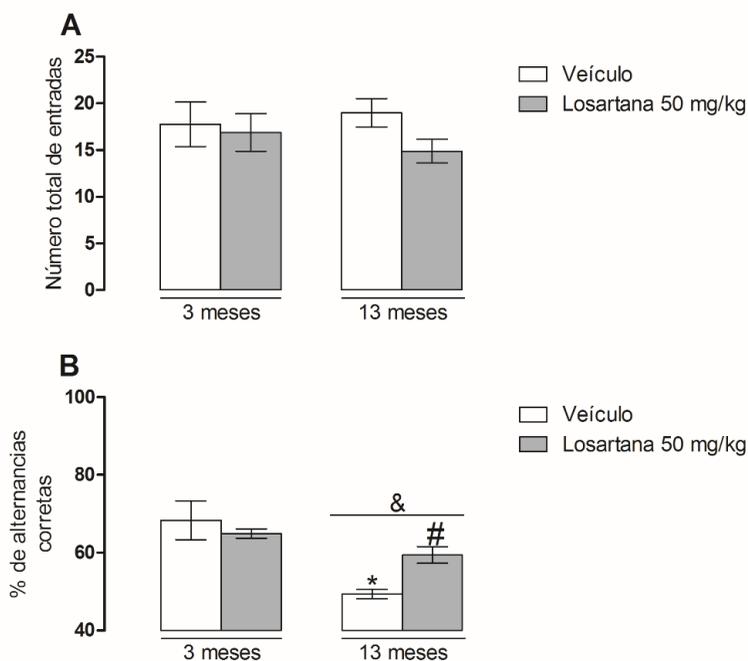


Figura 13. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) na memória de trabalho de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste do labirinto em Y realizado doze (12) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. (A) As barras verticais representam o número total de entradas nos braços do labirinto em Y. (B) As barras verticais representam o percentual de alternâncias corretas no

labirinto em Y (n= 9-10/grupo). * $P < 0,05$ comparado ao percentual de alternâncias corretas em relação aos respectivos animais controle e # $P < 0,05$ comparado ao grupo 13meses/veículo e & $P < 0,05$ comparado ao percentual de alternâncias corretas em relação ao fator idade (ANOVA fatorial).

2.6.4 Teste do campo aberto I

A Figura 14 mostra os resultados do teste do campo aberto, que foi realizado treze (13) dias após o início do tratamento com a losartana durante um período de 5 minutos. A ANOVA fatorial mostrou que não houveram diferenças significativas entre os grupos experimentais na distância total percorrida no campo aberto, sugerindo que os fatores idade [$F_{(1,36)}=1,74$, ($P \geq 0,05$)] e tratamento [$F_{(1,36)}=1,46$, ($P \geq 0,05$)] não alteram a atividade locomotora espontânea dos animais.

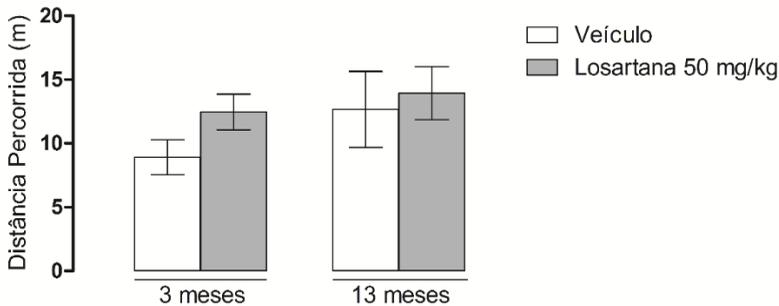


Figura 14. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste do campo aberto realizado treze (13) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. As barras verticais representam a distância total percorrida em metros pelos camundongos no campo aberto durante 5 min (n= 9-10/grupo).

2.6.5 Teste da realocação de objetos

A Figura 15 ilustra o desempenho dos diferentes grupos experimentais no teste da realocação de objetos realizado 14 dias após o início do tratamento com a losartana para a avaliação da memória espacial de curto prazo. A análise estatística revelou que os camundongos com 3 meses de idade tratados com o veículo ($t=2,90$, $P \leq 0,05$) ou a losartana ($t=2,92$, $P \leq 0,05$), bem como os camundongos com 13 meses de idade tratados com a losartana ($t=2,48$, $P \leq 0,05$) foram capazes de identificar o objeto realocado, investigando este por maior tempo do que aquele que

permaneceu na mesma posição, dados que refletem um maior índice de localização de objetos. Além disso, a análise estatística revelou que os animais com 13 meses de idade que receberam o veículo foram incapazes de distinguir entre o objeto realocado e o não realocado na sessão de teste ($t=0,63$, $P>0,05$).

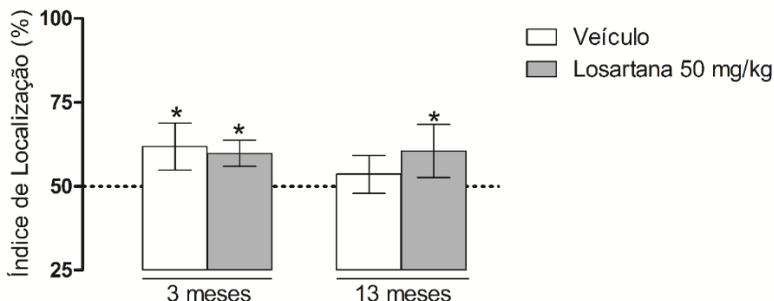


Figura 15. Efeitos do tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a memória espacial de curto prazo de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste da realocação de objetos realizado quatorze (14) dias após o início do tratamento com a losartana. Os dados são representados pela média \pm E.P.M. As barras representam o índice de localização que é expresso em percentual do tempo de investigação entre os objetos (tempo de investigação objeto realocado \times 100 / tempo de investigação no objeto realocado + tempo de investigação no objeto não realocado). * $P<0,05$ comparado aos 50% do tempo total de investigação (valor teórico) (teste t de Student) ($n=9-10$ /grupo).

2.6.6 Teste do esguicho

No décimo sexto (16) dia após o início do tratamento com a losartana, os camundongos foram avaliados no teste do esguicho. A ANOVA fatorial não revelou efeito significativo dos fatores analisados e da sua interação [$F_{(1, 36)}=3,2416$, ($P>0,05$)] (Figura 16).

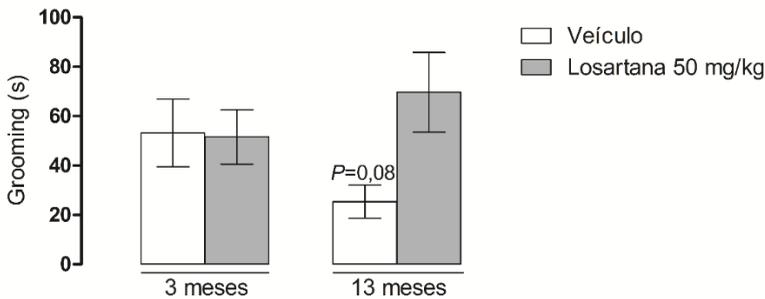


Figure 16. Efeitos do tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre o comportamento relacionado a anedonia em camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliado no teste do esguicho realizado dezesseis (16) dias após o início do tratamento com a losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. As barras verticais representam o tempo total de *grooming* (autolimpeza) durante 15 min (n= 9-10/grupo).

2.6.7 Teste do campo aberto II

A Figura 17 mostra os resultados do teste do campo aberto com duração de 60 minutos que foi realizado vinte (20) dias após o início do tratamento com a losartana. A ANOVA fatorial indicou ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais, demonstrando que não ocorreu prejuízo locomotor relacionado aos fatores idade [$F_{(1,30)}=0,04$, ($P \geq 0,05$)] e tratamento [$F_{(1,30)}=0,97$, ($P \geq 0,05$)].

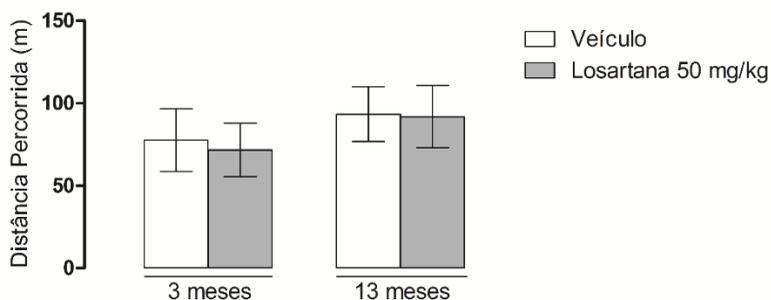


Figure 17. Efeitos do tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada durante 60 minutos no teste do campo aberto realizado vinte (20) dias após o início do tratamento com a losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. As barras verticais representam a distância percorrida em metros pelos camundongos no campo aberto (n= 7-10/grupo).

2.6.7 Teste do rotarod

A Figura 18 mostra os resultados do tratamento com losartana sobre a coordenação motora de camundongos com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste do rotarod. A ANOVA fatorial não revelou diferenças estatísticas para o desempenho basal dos camundongos dos diferentes grupos experimentais no teste do rotarod [$F_{(1,31)}= 0,02$, $P=0,88$]. Posteriormente, os animais foram reavaliados sete (7), quatorze (14) e vinte um (21) dias após o início do tratamento com a losartana. A ANOVA fatorial com medidas repetidas demonstra que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais [$F_{(2, 62)}=0,35$ $P>0,05$], indicando que o envelhecimento e o tratamento com a losartana não alteraram significativamente a coordenação motora e o equilíbrio dos animais.

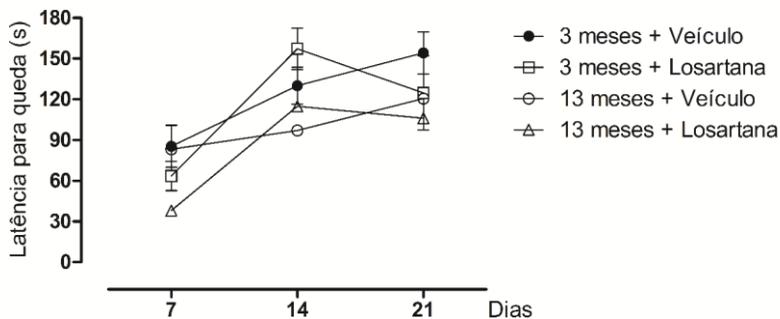


Figura 18. Efeitos do tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a coordenação motora de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliada no teste do rotarod. As linhas representam a latência para queda dos animais do cilindro em rotação no decorrer dos vinte e um (21) dias de tratamento. Os pontos que interconectam as linhas representam a média \pm E.P.M. (n= 7-10/grupo).

2.6.9 Peso corpóreo

A Figura 19 mostra o efeito da administração repetida com a losartana sobre o peso dos animais durante os vinte e um (21) dias de tratamento. A ANOVA fatorial com medidas repetidas não revelou alterações significativas no peso dos animais durante o período de tratamento [$F_{(3, 90)}=1,66$, ($P>0,05$)], indicando que o tratamento com a losartana não alterou significativamente o peso dos animais.

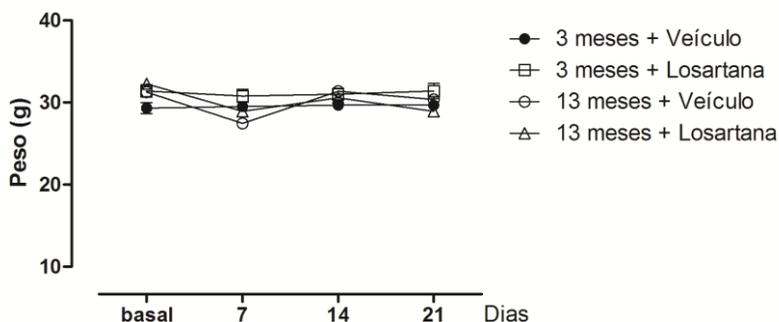


Figura 19. Efeitos do tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre o peso corporal de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade. As linhas representam o peso dos animais em grama no decorrer dos vinte e um (21) dias de tratamento. Os pontos que interconectam as linhas representam a média \pm E.P.M. (n= 7-10/grupo).

2.6.10 Pressão arterial sistólica

A Figura 20 mostra os resultados da mensuração da pressão sanguínea sistólica realizada vinte e dois (22) dias após o início do tratamento com a losartana. A ANOVA fatorial indicou um efeito significativo do fator idade [$F_{(1, 17)}=5,86$, ($P\leq 0,05$)], onde a análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que os animais com 13 meses de idade tratados com veículo apresentam uma maior pressão sanguínea sistólica quando comparados ao grupo 3 meses/veículo. Ainda, a ANOVA fatorial indicou um efeito significativo entre a interação dos fatores idade e tratamento [$F_{(1, 17)}=4,50$, ($P\leq 0,05$)], onde a análise *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento com a losartana foi capaz de reverter o aumento da pressão sanguínea sistólica nos animais com 13 meses quando comparados ao grupo 13 meses/veículo.

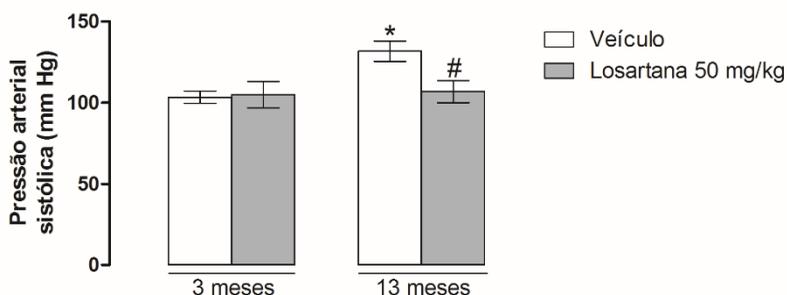


Figure 20. Efeitos do tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre a pressão arterial sistólica de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade na aferição realizada vinte e dois (22) dias após o início do tratamento com a losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. As barras verticais representam a pressão sanguínea sistólica dos animais em mmHg. * $P<0,05$ comparado ao grupo 3 meses/veículo; # $P<0,05$ comparado ao grupo 13 meses/veículo. (ANOVA fatorial seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls) ($n= 5-6$ /grupo).

2.6.11 Níveis dos receptores AT_1 e AT_2 para angiotensina II

A Figura 21 mostra o efeito da administração repetida com a losartana sobre o imunoconteúdo dos receptores AT_1 e AT_2 no córtex pré-frontal de camundongos de 3 e 13 meses de idade avaliado vinte e dois (22) dias após o início do tratamento com a losartana. A ANOVA fatorial não revelou alterações significativas nos níveis dos receptores AT_1

[$F_{(1,12)}=2,51, P>0,05$] e dos receptores AT_2 [$F_{(1,12)}=0,87, P>0,05$] ao final do protocolo.

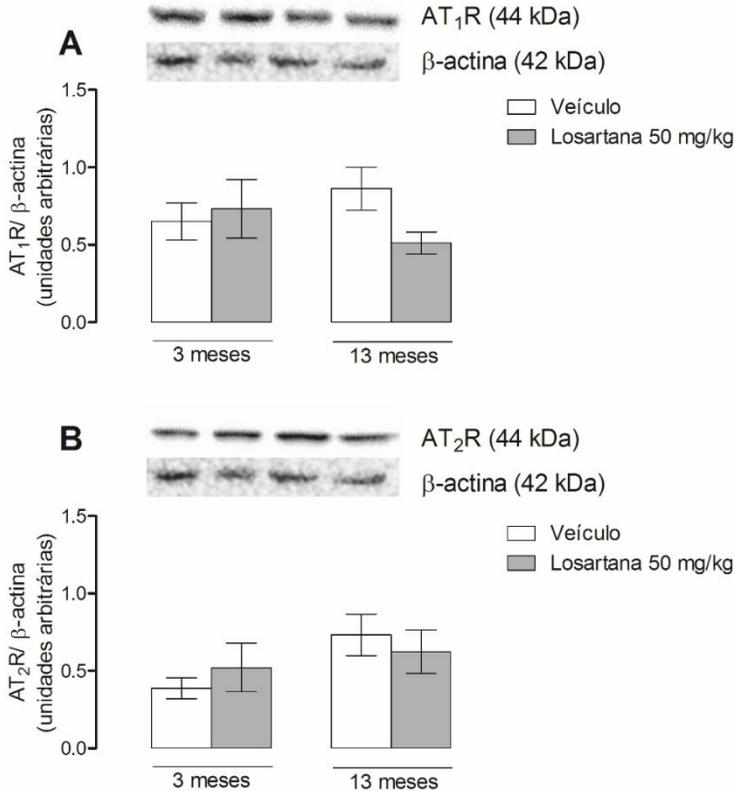


Figure 21. Efeitos do tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p.) sobre o imunocontéudo dos receptores para angiotensina II do tipo I (AT_1) e do tipo II (AT_2) no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 com 3 e 13 meses de idade avaliado através da técnica de western blotting realizada vinte e dois (22) dias após o início do tratamento com a losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. As barras verticais representam a densidade dos receptores em unidades arbitrárias. (A) Densidade dos receptores de angiotensina II do tipo I (AT_1) e (B) densidade dos receptores de angiotensina II do tipo 2 (AT_2) (n=4/grupo).

2.7 Discussão

O tratamento com a losartana foi capaz de reverter os prejuízos em escores neurológicos e nas memórias de trabalho e espacial observadas em camundongos envelhecidos com 13 meses de idade. Esses resultados representam uma importante contribuição para a literatura para a compreensão do papel dos receptores de angiotensina II do tipo 1 no SNC, onde pela primeira vez se demonstra os benefícios comportamentais do bloqueio desses receptores em animais envelhecidos.

No presente estudo utilizou-se animais com 13 meses de idade como modelo de envelhecimento. Obviamente que a seleção da idade para a experimentação vem sendo motivo de debate ao longo dos anos, principalmente pela ausência de um fator de correção fidedigno para equivaler a idade de um roedor à de um ser humano, tampouco, aplicar essa correção ao aumento da expectativa de vida da população.

Neste sentido, não existe um consenso na comunidade científica que determine em qual idade um roedor é considerado idoso. Alguns grupos de pesquisa defendem que a partir do 12º mês de idade o camundongo já pode ser considerado idoso (JACKSON LABORATORY, 2016), enquanto outros defendem que apenas a partir do 18º mês de idade ele possa ser definido como idoso (JACKSON LABORATORY, 2016). Apesar destas discordâncias, existe um consenso de que as alterações relacionadas a idade, como o declínio cognitivo, além de algumas alterações genéticas relacionadas ao processo de senescência são observados a partir do 10º mês de idade em camundongos (CUNEA; POWNER; JEFFERY, 2014; FLURKEY; MCURRER; HARRISON, 2007; SHOJI et al., 2016).

O Escore Neurológico de Severidade (ENS) foi utilizado para avaliar o estado neurológico geral dos animais 7 dias após o início do tratamento com a losartana. Como já descrito, o ENS é composto de uma série de tarefas que avaliam o estado neurológico geral do animal (SCHWARZBOLD et al., 2010). O presente teste foi desenvolvido inicialmente por Beni-Adani e colaboradores para correlacionar a gravidade de um traumatismo craniano e a lesão cerebral, sendo esta correlação avaliada através de estudos de ressonância magnética e histologia em camundongos (GOZES et al., 2005). O teste foi previamente padronizado em nosso laboratório (SCHWARZBOLD et al., 2010), e nos últimos anos observamos que este teste é sensível a alterações induzidas por neurotoxinas que modelam a DP (MATHEUS et al., 2012). Sendo assim, o ENS representa uma ferramenta útil para a avaliação de alterações sutis no estado neurológico dos animais.

Nossos resultados indicam pela primeira vez que o envelhecimento afeta de maneira significativa o desempenho de camundongos no ENS. O teste do ENS engloba uma grande diversidade de tarefas dependentes de áreas cerebrais distintas. O tratamento com a losartana atenuou os prejuízos no ENS apresentados pelos envelhecidos, embora não tenham sido observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle de animais com 3 meses tratados com o veículo. Uma possível explicação para que a resposta da losartana não tenha sido tão evidente foi o reduzido número de administrações, uma vez que o teste não foi repetido em estágios mais avançados do protocolo experimental. Além disso, considerando que o ENS não permite a conclusão de quais sistemas de neurotransmissão e áreas cerebrais o sistema renina-angiotensina estaria influenciando, foram empregados outros testes comportamentais.

O teste da discriminação olfatória foi empregado para avaliarmos possíveis prejuízos relacionados a olfação nos animais envelhecidos, bem como uma possível modulação dos receptores AT_1 nesta função. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, sendo que todos foram capazes de discriminar entre os ambientes familiar e não familiar. O prejuízo olfatório em decorrência da idade também é discutível em relação ao declínio sensorial relacionado a senescência, onde alguns autores observam prejuízos em animais envelhecidos com 10 meses de idade (REY et al., 2012), enquanto outros não observaram estas alterações (MORENO et al., 2014; REY et al., 2012). Foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que ratos Wistar apresentam prejuízo na discriminação olfatória neste mesmo teste a partir dos 12 meses de idade (PREDIGER et al., 2005). Por outro lado, outros grupos de pesquisa demonstram que não seria esperado o prejuízo olfatório nesta tarefa, uma vez que os animais envelhecidos apresentariam uma maior facilidade em reconhecer odores familiares (ENWERE et al., 2004; MORENO et al., 2014). Por outro lado, os animais envelhecidos apresentam prejuízos em tarefas de aprendizado relacionado a odores, ou na discriminação de odores semelhantes (MORENO et al., 2014). Sendo assim, a execução de testes adicionais é necessária para uma melhor avaliação dos efeitos da losartana e do papel do sistema renina-angiotensina na função olfatória de animais envelhecidos.

O tratamento com a losartana foi capaz de reverter os prejuízos de memória associados ao envelhecimento nos testes do labirinto em Y e realocação de objetos. O teste do labirinto em Y foi utilizado para a avaliação da memória de trabalho, onde os animais que executam a tarefa de forma correta apresentam um maior número de alternâncias corretas,

ou seja, investigam o labirinto de maneira a não repetir a entrada no braço previamente investigado (KING et al., 1999).

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de armazenamento, sendo classificadas em memórias de curta duração, longa duração ou memórias de trabalho (IZQUIERDO et al., 1999). A memória de trabalho ou operacional tem por definição a manutenção e a manipulação das informações por um curto intervalo de tempo, sendo que este tipo de memória possui por natureza a dinamicidade, processando ou manipulando as informações do ambiente ou provenientes das memórias de longa duração, ao invés de ser um local para o armazenamento de memórias de longo prazo (BADDELEY, 1992, 2012).

Apesar da memória de trabalho envolver também outras áreas cerebrais, o córtex pré-frontal representa a estrutura chave para o seu processamento. Estudos de imagem em humanos demonstram a ativação desta região durante a execução de testes envolvendo a memória de trabalho e lesões dessa estrutura em primatas não humanos e roedores produzem grandes prejuízos na memória de trabalho (COURTNEY, 1998; LEVY; GOLDMAN-RAKIC, 2000). O declínio relacionado a este tipo de memória é considerado um dos primeiros sinais do envelhecimento, apresentando um grande impacto na vida cotidiana da pessoa idosa, uma vez que estes indivíduos apresentam dificuldade de memorização, planejamento das atividades diárias e solução de diferentes tipos de problemas (BAJOR, 2013).

A realização do teste da realocação de objetos teve por objetivo a avaliação das memórias espaciais de curta duração (intervalo de 90 min entre as sessões de treino e teste). As memórias espaciais são em parte responsáveis pelo registro de informações do nosso ambiente e da nossa orientação espacial e formação de um mapa cognitivo (BURGESS; MAGUIRE; O'KEEFE, 2002). Utilizamos estas memórias, por exemplo, para navegar em torno de uma cidade ou bairro familiar. Este tipo de memória também engloba distintas áreas cerebrais, entretanto o hipocampo possui um papel chave na formação deste tipo de memória (BURGESS; MAGUIRE; O'KEEFE, 2002). As memórias espaciais geralmente estão prejudicadas em pacientes com a doença de Alzheimer (PENGAS et al., 2012), sendo que alguns trabalhos sugerem que testes para investigar possíveis prejuízos neste tipo de memória, poderiam ser importantes ferramentas para o diagnóstico preditivo em indivíduos idosos de uma futura manifestação clínica da doença de Alzheimer (GAZOVA et al., 2012).

Por outro lado, o declínio nas memórias espaciais é observado com o processo fisiológico do envelhecimento (GAZOVA et al., 2012).

Este declínio nas memórias espaciais geralmente está acompanhado de uma redução do volume hipocampal (KONISHI; BOHBOT, 2013). Além do hipocampo, uma série de trabalhos demonstraram que o envelhecimento também afeta diferentes áreas cerebrais (incluindo o córtex pré-frontal) e suas conectividades, afetando o aprendizado e a evocação deste tipo de memória, tanto em humanos (HOLDEN; GILBERT, 2012; MONTEFINESE et al., 2015; PENNER; MIZUMORI, 2012), quanto em modelos animais (CHOW et al., 2015; HOLDEN; GILBERT, 2012).

O sistema renina-angiotensina pode contribuir diretamente nos processos mnemônicos, uma vez que participa de diversos processos como o crescimento, a diferenciação e a migração celular, principalmente mediadas pelos receptores AT₂ (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; KERR et al., 2005). No entanto, a literatura carece de estudos que aprofundem o entendimento de como a modulação desse sistema estaria atuando nos processos de aprendizado e memória.

Kerr e colaboradores demonstraram o envolvimento do sistema renina-angiotensina no processo de consolidação de memórias, mostrando que a administração bilateral de angiotensina II na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar foi capaz de impedir a consolidação de memórias, de forma dose-dependente, quando administrada imediatamente ou até 30 min após a cessão de treino no teste da esquiwa ativa do tipo *step-down*, sem alterar a atividade locomotora e comportamentos do tipo ansiedade. Esse efeito foi completamente abolido pela administração de um antagonista dos receptores AT₂, mas não pela administração de losartana, antagonista dos receptores AT₁. Além disso, este efeito não foi mimetizado pela angiotensina IV ou pela angiotensina II exógena (KERR et al., 2005).

É sabido que a administração de losartana ou inibidores da ECA apresentam efeitos nootrópicos, facilitando a retenção das memórias, tanto espaciais quanto memórias de curta e longa duração em animais adultos (RAGHAVENDRA; CHOPRA; KULKARNI, 2001). Os mecanismos discutidos por alguns autores é de que o bloqueio dos receptores AT₁ levaria a uma redução do estresse oxidativo cerebral, facilitando os processos de aquisição de memórias (BILD et al., 2013; HARUYAMA et al., 2014). Além disso, alguns autores relatam que o sistema renina-angiotensina estaria interagindo com o sistema colinérgico, uma vez que a administração de angiotensina II inibiu a liberação de acetilcolina em um estudo *in vitro* (ARRANG; DRUTEL; SCHWARTZ, 1995).

O sistema colinérgico apresenta um papel importante nos processos de aprendizado e memória (CARRUTHERS; GURVICH; ROSSELL, 2015), participando do declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento e na doença de Alzheimer (BARTUS et al., 1982). O sistema colinérgico é capaz de interagir com uma ampla variedade de sistemas de neurotransmissão, incluindo o sistema renina-angiotensina, dopaminérgico, gabaérgico, opioide, entre outros, que também são importantes nesses processos, tornando apenas especulativo o mecanismo específico pelo qual o sistema seria capaz de modular os processos de aprendizado e memória (DECKER; MCGAUGH, 1991; KUTLU; GOULD, 2016). Neste sentido, são necessários experimentos melhor desenhados com a modulação farmacológica das vias de sinalização e a identificação de possíveis interações receptor-receptor para uma melhor compreensão de como o sistema renina-angiotensina estaria interagindo com outros sistemas de neurotransmissão. Portanto, apesar de sermos o primeiro grupo a demonstrar o efeito do bloqueio dos receptores AT₁ sobre o aprendizado e a memória em animais envelhecidos, são necessários experimentos adicionais para tentarmos elucidar os mecanismos pelos quais a losartana estaria exercendo seus efeitos benéficos neste contexto.

Ainda, como demonstrado neste trabalho, o tratamento com a losartana foi capaz de normalizar a pressão arterial sistólica dos animais envelhecidos e não alterou a pressão arterial sistólica nos animais controle. A hipertensão é uma epidemia global, caracterizando-se por ser uma doença multifatorial que afeta aproximadamente 50% das pessoas acima dos 65 anos de idade nos EUA e aproximadamente um bilhão de pessoas em todo o mundo (KUMAR, 2013). Além disso, também é uma das principais causas do declínio cognitivo vascular (O'BRIEN et al., 2003).

Estudos clínicos demonstram que, de maneira geral, o tratamento com fármacos anti-hipertensivos melhoram o estado neuropsicológico dos indivíduos hipertensos, sem todavia melhorar o desempenho cognitivo quando comparados com indivíduos normotensos (FEIGIN; RATNASABAPATHY; ANDERSON, 2005; MULDOON et al., 2002; STAESSEN; RICHART; BIRKENHAGER, 2007). A melhora cognitiva observada nos pacientes hipertensos estaria associada ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral, além da redução de danos na vasculatura cerebral causados pela hipertensão, inclusive reduzindo o risco de acidentes vasculares cerebrais (MULDOON et al., 2002; RICHARD JENNINGS et al., 2010).

Ratos espontaneamente hipertensos da linhagem SHR (do inglês: *spontaneous hypertensive rat*) apresentam prejuízos de aprendizado e memória associados a alterações nos sistemas colinérgico, dopaminérgico e adenosinérgico (FERGUSON; CADA, 2004; PREDIGER; FERNANDES; TAKAHASHI, 2005a). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo devem ser analisados com cautela, uma vez que: (I) os animais C57Bl/6 não desenvolvem hipertensão espontaneamente; (II) os valores da pressão arterial sistólica encontrados estão abaixo do esperado (120 mmHg) nos animais controle e envelhecidos tratados com losartana; (III) a média da pressão arterial sistólica do grupo envelhecidos veículo foi de 131,64 mmHg (LERMAN et al., 2005; MATTSON, 2001).

No presente estudo, a medida da PA foi realizada pelo método de pletismografia de cauda, um método não invasivo, mas muito estressante para os animais, ocasionado pela contenção, motivo pelo qual a medida da PA foi apenas realizada no fim do protocolo, para evitarmos uma influência sobre o desempenho dos animais nos testes comportamentais. Não foram encontrados trabalhos que realizaram medidas da PA em camundongos C57Bl/6 envelhecidos, talvez por não serem utilizados comumente nos estudo de hipertensão (LERMAN et al., 2005). Por outro lado, devemos investigar futuramente se a redução da PA observada no presente estudo com a losartana em camundongos envelhecidos estaria relacionada com o emprego da técnica, que para uma melhor detecção do sistema utiliza-se a sala de experimentação a 30° C, além do animal ficar sobre uma manta térmica. Além disso, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o tratamento com losartana por via i.p. não gerou alterações no peso dos animais, sugerindo um padrão normal de ingestão alimentar.

De maneira geral, a população idosa está mais predisposta a sintomas psiquiátricos, como a anedonia (GLAESMER et al., 2011). A anedonia pode ser definida como a diminuição na capacidade de sentir prazer e também como a falta de reatividade a estímulos, onde diversas vias neurais (regiões estriatais, hipocampais, córtex pre-frontal, entre outras) parecem estar envolvidas, tornando o cenário complexo e pouco compreendido (PIZZAGALLI, 2014). Malatynka e colaboradores demonstraram que camundongos C57Bl/6 com 18 meses de idade apresentam sintomas anedônicos quando avaliados no teste da preferência da sacarose e no teste do esguicho (MALATYNSKA et al., 2012). Nossos resultados, apesar de apresentarem uma tendência estatística para um comportamento anedônico dos animais envelhecidos, não foi observado o comportamento, tampouco podemos concluir que a losartana foi capaz de atenuar ou reverter esta alteração na emocionalidade.

Ao iniciarmos o estudo, hipotetizamos que o tratamento com a losartana fosse capaz de prevenir o aparecimento de um comportamento anedônico associado ao envelhecimento, uma vez que estruturas cerebrais como o hipocampo, o estriado e o córtex pré-frontal parecem apresentar um papel fundamental nos transtornos de humor (ZHENG; ZHANG, 2015). Além disso, os receptores para angiotensina II AT_1 e AT_2 são expressos nessas áreas e há indícios de que ocorra um aumento da expressão de AT_1 em estados patológicos e que o receptor AT_2 , que é normalmente pouco expresso, aumentaria sua densidade para tentar contrabalancear os efeitos deletérios promovidos por AT_1 (VILLAR-CHEDA et al., 2010). No entanto, não existe nenhum trabalho prévio na literatura avaliando os níveis destes receptores em camundongos envelhecidos. De maneira pioneira, observamos que os níveis dos receptores AT_1 e AT_2 no córtex pré-frontal de camundongos não são modificados pelo envelhecimento ou pelo tratamento com losartana. Diante destes resultados, torna-se fundamental a avaliação de possíveis alterações dos níveis dos receptores AT_1 e AT_2 em animais com maior idade (18-24 meses) e em outras áreas cerebrais, como o hipocampo, em consequência do envelhecimento e do tratamento com a losartana, sendo que estes estudos já estão em andamento em nosso laboratório.

O envelhecimento não foi capaz de promover prejuízos motores nos animais avaliados nas tarefas do campo aberto e do rotarod, como já descrito na literatura, sendo que este tipo de prejuízo é apenas observado após 18 meses de idades ou idade superior em camundongos C57Bl/6 (MALATYNSKA et al., 2012). Ainda, a modulação do sistema renina-angiotensina não é capaz de induzir alterações motoras, apesar dos receptores estarem presentes nas áreas cerebrais relacionadas e este tipo de comportamento, e os receptores AT_1 estarem intimamente relacionados com os receptores D_2 de dopamina, onde o bloqueio dos receptores AT_1 levaria a um efeito inibitório sobre os receptores D_2 , favorecendo a liberação de dopamina, não são observadas diferenças significativas dos tratamentos, onde os receptores AT_1 estariam possivelmente participando do ajuste fino da neurotransmissão dopaminérgica (MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2015; SAAVEDRA, 1999, 2005).

2.8 Conclusão

Em conjunto, os resultados deste capítulo fornecem evidências pioneiras de que a losartana, um antagonista dos receptores AT_1 para a angiotensina II, foi capaz de reverter os prejuízos nas memórias de

trabalho e espacial relacionados a diferentes estruturas cerebrais, como o córtex pré-frontal e o hipocampo. Sendo assim, a investigação do potencial terapêutico do sistema renina-angiotensina no SNC no âmbito do envelhecimento torna-se uma linha de pesquisa muito interessante para futuros estudos.

3 CAPÍTULO 2: O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A DOENÇA DE PARKINSON

3.1 A doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que afeta 1-2% da população acima dos 60 anos de idade, sendo que essa proporção aumenta com o avanço da idade (DE LAU; BRETELER, 2006). Nos EUA existem aproximadamente 500 mil portadores da DP, e são reportados mais de 50 mil casos novos todos os anos (LANDRIGAN et al., 2005). Segundo os últimos dados divulgados pelo IBGE (2000), existiam aproximadamente 220 mil parkinsonianos no Brasil; sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos de idade são acometidos por essa doença, dados estes que refletem a mesma incidência observada no restante da população mundial.

Classicamente, a doença está relacionada com prejuízos na função motora, sendo o seu diagnóstico baseado no aparecimento de sintomas motores cardinais (bradicinesia somado ao tremor de repouso ou a rigidez muscular), além de ser caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos que se projetam da substância negra parte compacta (SNpc) para o corpo estriado (via nigroestriatal). Entretanto, os sintomas motores somente se tornam evidentes quando o processo neurodegenerativo já acometeu cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, verificando-se uma redução de aproximadamente 80% dos níveis de dopamina no estriado (FEARNLEY; LEES, 1991; DE LA FUENTE-FERNANDEZ et al., 2011).

Por outro lado, a DP afeta também outros sistemas de neurotransmissão além do dopaminérgico, como os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico, colinérgico e adenosinérgico, sendo que o desequilíbrio desses sistemas contribui para o aparecimento dos sintomas não motores, como, por exemplo: prejuízos olfatórios, depressão, transtornos de ansiedade e prejuízos cognitivos (PREDIGER, 2010; PREDIGER et al., 2012).

Atualmente sabe-se que muitos sintomas não motores da DP antecedem em muitos anos o aparecimento dos sintomas motores clássicos. Através de um estudo pioneiro de Braak e colaboradores (2004), a existência dos diferentes estágios da DP ganharam maior importância na última década (BRAAK et al., 2004). Neste estudo, os autores classificaram a doença em 6 estágios com base nas diferentes áreas cerebrais afetadas e sintomas associados à cada estágio (Figura 22) (BRAAK et al., 2003; CHAUDHURI; HEALY; SCHAPIRA, 2006).

Neste sentido, existe a expectativa de que o avanço do conhecimento acerca desses sintomas iniciais permita que no futuro o diagnóstico seja realizado nas fases iniciais da doença, permitindo que novas abordagens terapêuticas sejam introduzidas quando o processo neurodegenerativo não esteja em estágios avançados (PREDIGER et al., 2010; BHIDAYASIRI; TRUONG, 2012).

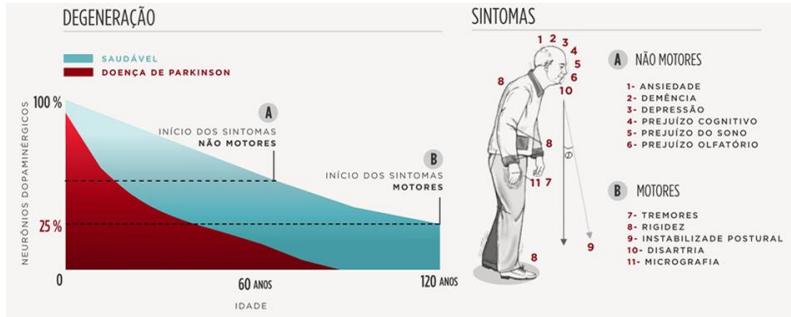


Figura 22. Ilustração das principais características da doença de Parkinson: neurodegeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos e o aparecimento dos sintomas motores e não motores. Adaptada de AGUIAR; PREDIGER, 2012.

Além da neurodegeneração da via nigroestriatal, outro marcador neuropatológico da DP é o aparecimento dos corpos de Lewy. Os corpos de Lewy são estruturas intracitoplasmáticas eosinofílicas, com um núcleo denso rodeado por um halo, formados principalmente pelo acúmulo da proteína α -sinucleína, além de ubiquitina, parkina e neurofilamentos. Apesar de sua presença não ser exclusiva da doença, ela é considerada um marcador neuropatológico da DP sendo utilizada no diagnóstico *post mortem* definitivo (Figura 23) (VENDA et al., 2010).



Figura 23. Figura ilustrando as principais características neuropatológicas da doença de Parkinson: perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) e a formação dos corpos de Lewy. Adaptada de Prediger e colaboradores (2011).

Apesar do grande avanço no conhecimento sobre a DP, a causa primária dessa doença permanece desconhecida. Alguns autores descrevem que a DP é um excelente modelo de uma doença neurológica multifatorial na qual existe uma combinação de diversos fatores, tais como o envelhecimento, a susceptibilidade genética e fatores ambientais que interagem de diferentes formas para causarem a neurodegeneração e, por consequência, levando ao seu desenvolvimento (VENDA et al., 2010). Aproximadamente 10% dos casos da DP apresentam origem genética, sendo que os 90% restantes estão relacionados com a forma esporádica da doença (DP idiopática), sendo o envelhecimento um dos principais fatores de risco (DI MONTE; LAVASANI; MANNING-BOG, 2002; DE LAU; BRETELER, 2006).

O tratamento farmacológico da DP utilizado atualmente consiste no restabelecimento da disfunção dopaminérgica por meio da administração do precursor da dopamina, agonistas e inibidores da degradação de dopamina, além de antagonistas colinérgicos, exemplificados na Tabela 3 (MULLER et al., 1998). A L-dopa, um precursor da dopamina, que teve o seu primeiro relato em síndromes parkinsonianas em coelhos administrados com reserpina em 1950 por Arvid Carlsson, representa até hoje o maior avanço terapêutico para a DP (CARLSSON, 1975; SEIDEN; CARLSSON, 1963).

Contudo, esses fármacos representam alternativas paliativas para o tratamento da DP, uma vez que não interferem diretamente no processo neurodegenerativo. Ainda, existem diversos efeitos colaterais agudos e tardios, como efeitos periféricos: distúrbios gastrintestinais, bradicardia, taquicardia, arritmia, boca seca e cefaleias; e efeitos centrais: ataxia, distúrbios motores e do sono, e deficiências cognitivo-psiquiátricas (KARIYA et al., 2005).

Tabela 3. Principais fármacos utilizados atualmente para o tratamento da doença de Parkinson

Fármaco (nome comercial)	Posologia inicial	Mecanismo de ação
L-Dopa (SINEMET®)	25/100 mg (carbidopa/L-Dopa, 3 x ao dia	Precursor da dopamina
Bromocriptina (PARLODEL®)	1,5 mg, 2 x ao dia	Agonista dopaminérgico
Pramipexol (MIRAPEX®)	0,125 mg, 3 x ao dia	Agonista dopaminérgico
Entacapone (COMTAN®)	200 mg, até 5 x ao dia	Inibidor da catecol-O-metiltransferase
Rasagilina (AZILECT®)	1 mg, por dia	Inibidor da monoamino oxidase B
Selegilina (DEPRENIL®)	5 mg, 2 x ao dia	Inibidor da monoamino oxidase B
Amantadina (SYMMETREL®)	100 mg, 2 x ao dia	Inibidor da liberação/captação de dopamina
Biperideno (AKINETON®)	1 mg, 2 x ao dia	Antagonista colinérgico dos receptores muscarínicos

Tabela 1. Adaptado de DEL-BEL et al., 2015.

Por essa razão, verifica-se atualmente uma busca por novas alternativas terapêuticas para a DP, capazes de minimizarem os efeitos colaterais e reverter, ou ao menos retardar, o processo neurodegenerativo. Nesse sentido, a modulação do sistema renina-angiotensina emerge como uma alternativa terapêutica na DP (KONINGS et al., 1994; SKOV et al., 2014).

3.2 Modelos animais para o estudo da doença de Parkinson: ênfase no modelo da administração intranasal de MPTP em roedores

Os modelos animais vêm contribuindo de forma importante para o avanço do conhecimento sobre a DP e também para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o seu tratamento. Os modelos para

o estudo da DP dividem-se em dois grandes grupos: modelos genéticos e modelos baseados na administração de neurotoxinas (GUBELLINI; KACHIDIAN, 2015).

Não existe um consenso de qual seria o melhor modelo para mimetizar a natureza progressiva da DP e se os modelos experimentais atuais seriam capazes de diferenciar as características pré-motoras e motoras da doença em humanos (MEREDITH; KANG, 2006). Portanto, uma melhor compreensão sobre os diferentes modelos utilizados para o estudo da DP pode aumentar a capacidade dos pesquisadores em empregar os modelos apropriados de acordo com os objetivos de seus estudos.

Os modelos genéticos baseiam-se em mimetizar as principais alterações encontradas na forma familiar da doença, como disfunções mitocondriais, disfunções na via proteossoma-ubiquitina e alterações na formação de radicais livres, utilizando invertebrados ou animais com mutações genéticas. (para revisão Dawson et al. 2010).

Por outro lado, as principais toxinas empregadas para o estudo da DP são: 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), rotenona e o paraquat (GUBELLINI; KACHIDIAN, 2015). A 6-OHDA é captada pelos transportadores de noradrenalina (NAT) e dopamina (DAT) para o interior da célula, sofrendo auto-oxidação e produzindo EROs, levando a morte neuronal. Esta toxina é incapaz de atravessar a BHE, portanto deve ser administrada diretamente no SNC (GUBELLINI; KACHIDIAN, 2015).

A rotenona difunde-se para o interior da célula onde irá promover a inibição do complexo 1 mitocondrial, além de inibir a formação de microtúbulos do citoesqueleto, levando a morte neuronal. Dentre as desvantagens deste modelo estão o alto índice de mortalidade dos animais e a baixa reprodutibilidade (FLEMING, 2004). O herbicida paraquat é captado para o interior da célula pelo NAT, produzindo EROs, levando a morte celular. Uma das principais desvantagens na administração do paraquat está na grande variabilidade no grau de degeneração na via dopaminérgica nigroestriatal (MILLER, 2007).

O MPTP se difunde através da BHE, sendo oxidado e convertido em seu metabólito tóxico, o 1-metil-4-fenilperidina (MPP⁺) nos astrócitos através da ação da enzima monoamino oxidase B (MAO-B). Posteriormente, o MPP⁺ é captado para o interior do neurônio dopaminérgico através do DAT e sua ação ocorre através da inibição do complexo I da cadeia respiratória de elétrons (para revisão, ver PREDIGER et al., 2010).

Os efeitos do MPTP são dependentes da espécie estudada, sendo que em primatas o MPTP induz sintomas e alterações neuroquímicas praticamente indistinguíveis da DP idiopática (LANGSTON et al., 1983; KOPIN; MARKEY, 1988). Os roedores não apresentam toda a sintomatologia da doença, sendo que os efeitos da administração do MPTP são dependentes da espécie, linhagem, gênero e idade dos animais, além do regime de tratamento (SEDELIS et al, 2000; SCHMIDT; FERGER, 2001).

A forma idiopática da DP apresenta um forte componente ambiental, como mencionado anteriormente. Nesta vertente, tem se hipotetizado que uma das portas de entrada de agentes neurotóxicos (vírus, metais, toxinas, agentes químicos) ao SNC seria através da via nasal (DOTY, 2008; PREDIGER et al., 2012). Com isso, o modelo da administração intranasal (i.n.) de MPTP desenvolvido em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2009; PREDIGER et al., 2010) teve como objetivo reproduzir a porta de entrada de toxinas no organismo, além de relacionar a toxicidade do MPTP com o avanço do processo neurodegenerativo e os sintomas da DP. De maneira importante, foi demonstrado recentemente que existe uma via dopaminérgica direta interligando o bulbo olfatório e a substância negra em roedores e que toxinas como o MPTP e a 6-OHDA induzem neurodegeneração na substância negra quando administradas pela via i.n. (HÖGLINGER et al., 2015). Kadar e colaboradores demonstraram que após a administração i.n., o MPTP é convertido em MPP⁺ e apresenta uma rápida distribuição no SNC (apresentando pico em 30 min após a administração), mas em um segundo momento o metabólito ativo concentra-se em áreas como o bulbo olfatório, gânglios basais, locus cerúleus e mesencéfalo ventral (KADAR et al., 2014)

De acordo com o estadiamento da doença proposto por Braak e colaboradores (2004) e reproduzindo o quadro clínico da DP, os roedores submetidos a administração i.n. de MPTP apresentaram uma disfunção precoce na discriminação olfatória, reconhecimento social e memórias de procedimento e operacional no labirinto aquático de Morris (PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2010). Além disso, a infusão i.n. de MPTP em camundongos C57Bl/6 reduziu significativamente os níveis de tirosina hidroxilase (enzima limitante na síntese de dopamina e outras catecolaminas) no bulbo olfatório, estriado e substância negra, além de reduzir as concentrações de dopamina em diferentes áreas cerebrais como o bulbo olfatório, estriado e córtex pré-frontal, (PREDIGER et al., 2010). Por outro lado, deve ser destacado que os prejuízos da função motora observados após a administração i.n. de MPTP variam de acordo com a

espécie e idade dos animais em estudo, sendo que prejuízos motores não foram observados em camundongos da linhagem C57Bl/6 com 6 meses de idade (PREDIGER et al., 2010), sendo somente observados em camundongos desta linhagem com 15 meses de idade (MATHEUS et al., 2012). Portanto, a utilização do modelo da administração i.n. do MPTP torna-se uma ferramenta importante para o estudo dos sintomas pré-motores da DP.

3.3 Sistema renina-angiotensina na Doença de Parkinson

Como descrito anteriormente, a DP é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada por uma intensa degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Esse processo neurodegenerativo tem como principais efetores processos neuroinflamatórios, que em grande parte são gerados pelo estresse oxidativo, e a disfunções mitocondriais como os pivôs para o processo de morte celular.

Estudos epidemiológicos indicam que a maioria dos casos da DP é acompanhada de comorbidades, como distúrbios psiquiátricos (aproximadamente 41% dos pacientes) e doenças cardiovasculares (aproximadamente 35% dos pacientes), como hipertensão ou hipotensão ortostática. No entanto não existem estudos que indiquem se esses fatores são causa ou consequência da DP (MORGAN; SETHI, 2005).

O desenvolvimento de fármacos antagonistas dos receptores AT₁ para angiotensina II (Tabela 4) tem por finalidade controlar a pressão sanguínea de indivíduos hipertensos. Mais tardiamente observou-se que essa classe de drogas era também capaz de melhorar os processos inflamatórios sistêmicos e com efeitos benéficos sobre o metabolismo (ISMAIL et al., 2010; MICHEL et al., 2013). Ainda, essa classe de fármacos apresenta um pronunciado efeito neuroprotetor em diferentes situações, principalmente associados a fatores patogênicos que aumentam a atividade dos receptores AT₁, como: processos inflamatórios, hipóxia, alterações vasculares, redução na suplementação de nutrientes e lesões celulares (BENICKY et al., 2011a; SIRONI, 2004).

Tabela 4. Principais antagonistas dos receptores AT₁ para angiotensina II disponíveis comercialmente.

Fármaco (nome comercial)	Posologia inicial diária (mg)	Tempo de meia vida (horas)
Losartana (COZAAR®)	50-100	6 - 9
Candesartana (ATACAND®)	4 - 32	9
Telmisartana (MICARDIS®)	48 - 80	24
Valsartana (DIOVAN®)	80 - 320	6
Ibesartana (AVAPRO®)	150 - 300	11 - 15
Olmesartana (BENICAR®)	10 - 40	14 - 16
Azilsartana (EDARBI®)	40 - 80	11
Eprosartana (TEVETEN®)	400 - 800	5

Tabela 1. Adaptado de MICHEL e colaboradores (2013).

Os fármacos pertencentes a esta classe são capazes de atravessar a BHE, podendo ocorrer aumento da sua captação para o SNC em casos de tratamento crônico, hipertensão e traumatismo craniano (MICHEL et al., 2013). Foi demonstrado que esta classe de fármacos é capaz de preservar a integridade da BHE, protegendo o SNC da ação de macrófagos e a passagem de substâncias presentes na circulação capazes de induzir a morte neuronal (KUCUK et al., 2002).

Outros estudos têm demonstrado os efeitos neuroprotetores dos antagonistas dos receptores para angiotensina II do tipo I em modelos animais de acidente vascular cerebral, traumatismo craniano e doença de Alzheimer, sendo que os mecanismos pelos quais são exercidos esses efeitos não foram elucidados (BENICKY et al., 2011a; CHRYSANT, 2012; HAJJAR; RODGERS, 2013; LIU et al., 2012b; VILLAPOL et al., 2012).

Foi demonstrado que o tratamento com L-dopa é capaz de aumentar os níveis de ECA no líquido cefalorraquidiano em pacientes com a DP em comparação com pacientes não tratados (KONINGS et al., 1994). Por outro lado, estudos *pós mortem* em pacientes portadores da DP revelaram uma redução dos receptores AT₁ no corpo estriado. Entretanto, esses resultados podem estar relacionados com o tratamento, e não diretamente com a doença, uma vez que na maioria dos estados patológicos, como a DP, acidentes vasculares cerebrais e traumatismos cranianos, ocorre um aumento da expressão dos receptores AT₁ e AT₂

tanto em humanos quanto em modelos animais (BENICKY et al., 2011a). Além disso, uma série de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a angiotensina II, via ativação dos receptores AT₁, exacerba a morte de neurônios dopaminérgicos (LABANDEIRA-GARCIA et al., 2012).

Em estudos usando modelos animais da DP foi demonstrado que o pré-tratamento durante 5 dias com a losartana (90 mg/kg, i.p) é capaz de prevenir a morte neuronal induzida pela neurotoxina 6-OHDA (MORADGANJEH; ZIAI; ROGHANI, 2013). Foi também demonstrado que o tratamento com candesartana (um antagonista dos receptores AT₁) tem efeito neuroprotetor frente as alterações promovidas pela 6-OHDA, mas que o tratamento não é capaz de alterar os níveis de dopamina, serotonina e seus metabólitos no estriado. Entretanto, a candesartana induziu um aumento nos níveis dos receptores D₁ e redução dos níveis de D₂ para dopamina no estriado dos animais lesionados com 6-OHDA (DOMINGUEZ-MEIJIDE et al., 2014; MORADGANJEH; ZIAI; ROGHANI, 2013).

De maneira importante, foi previamente demonstrado que a losartana não interfere na captação do MPTP pelos neurônios e na conversão do MPTP em MPP⁺ (GRAMMATOPOULOS et al., 2007). Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que a losartana foi capaz de prevenir *in vitro* a morte de neurônios dopaminérgicos frente ao MPP⁺, além de prevenir a morte de neurônios dopaminérgicos no estriado e na substancia negra de camundongos induzidos pela administração i.p. de MPTP (GRAMMATOPOULOS et al., 2007). Neste mesmo sentido, Sathiya e colaboradores demonstraram que a telmisartana (um antagonista dos receptores AT₁) previne as alterações motoras induzidas pela administração i.p. do MPTP, sendo que essa prevenção estaria relacionada com um aumento nos níveis de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) e da glia (GDNF) no corpos estriado de camundongos (SATHIYA et al., 2013).

3.3 Justificativa e hipótese do trabalho

Embora existam trabalhos prévios mostrando os efeitos neuroprotetores de antagonistas dos receptores AT₁ em modelos animais da DP, até o presente momento não foram investigados os efeitos destes fármacos sobre os sintomas não motores da DP. Sendo assim, hipotetizamos que o pré-tratamento com a losartana, um antagonista dos receptores para angiotensina II do tipo 1, seja capaz de prevenir as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo tratamento i.n. com MPTP em camundongos, usado como um modelo animal da fase pré-motora da DP.

3.4 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do pré-tratamento com a losartana nas alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo tratamento i.n. com MPTP em camundongos C57Bl/6.

3.4.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com losartana nos prejuízos neurológicos induzidos pela administração i.n. de MPTP através da utilização do Escore Neurológico de Severidade;

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com a losartana nas possíveis alterações sensoriais, cognitivas e locomotoras induzidas pela administração i.n. de MPTP avaliados nos testes da discriminação olfatória, labirinto em Y, realocação de objetos e campo aberto;

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com a losartana em comportamentos do tipo depressivo induzidos pela administração i.n. de MPTP avaliados através do teste do nado forçado;

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com losartana e pela administração i.n. de MPTP nos níveis da enzima tirosina hidroxilase e dos receptores para angiotensina II do tipo 1 e 2 no corpo estriado de camundongos;

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com a losartana e pela administração i.n. de MPTP nas medidas da pressão arterial sistêmica, diurese, consumo hídrico e medida de eletrólitos presente na urina dos animais.

3.5 Material e Métodos

3.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 com 6 meses de idade provenientes da colônia de expansão do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas retangulares (49 x 34 x 16 cm). Os animais foram mantidos em gabinetes climatizados (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos desta tese estão de acordo com os padrões éticos legais e foram aprovados pela Comissão de Ética para o uso de animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo número PP0830/2013.

3.5.2 Drogas

A losartana foi dissolvida em solução fosfato salino pH 7,4 (PBS), o PBS foi utilizado como solução veículo. A losartana (50 mg/kg) foi administrada durante 22 dias pela via i.p. sempre ao final do ciclo claro (18:00 h), para evitarmos o viés dos efeitos agudos do fármaco. A seleção da dose de losartana baseou-se em um estudo piloto e em trabalhos prévios publicados na literatura (GRAMMATOPOULOS et al., 2007; SUZUKI et al., 1992).

Cinco (5) dias após o início do tratamento com a losartana (50 mg/kg), os animais foram submetidos à administração i.n. da pró-neurotoxina MPTP (1 mg/narina), de acordo com o procedimento previamente padronizado em nosso laboratório (PREDIGER et al., 2010).

Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano a 0,96% (0,75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil.) utilizando um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., WI, EUA) e um tubo de polietileno (10 mm de diâmetro) foi introduzido cerca de 7 mm nas narinas dos animais. O tubo foi conectado a uma bomba peristáltica programada para realizar uma infusão de 25 µl/min, como pode ser observado na Figura 24. O MPTP foi dissolvido em NaCl 0,9% na concentração de 20 mg/ml, e foi infundido durante 2 min (1 mg/narina). A solução controle consistiu de NaCl 0,9% administrada pela via i.n.. Após um intervalo de 5 min, para os animais recuperarem a função respiratória normal, esse procedimento foi repetido para a infusão de veículo ou MPTP na narina contralateral.

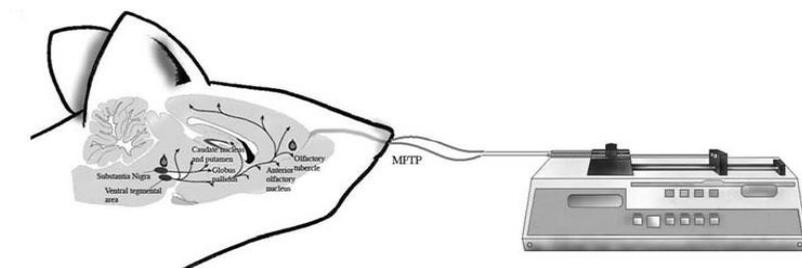


Figura 24: Esquema do procedimento utilizado para a administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) em camundongos (PREDIGER et al., 2010).

3.5.3 Testes comportamentais

3.5.3.1 Avaliação do Escore Neurológico de Severidade

Realizou-se o teste comportamental conforme descrito anteriormente no item 2.5.3.1 na página 15.

3.5.3.2 Teste da discriminação olfatória

Realizou-se o teste comportamental conforme descrito anteriormente no item 2.5.3.2 na página 16.

3.5.3.3 Teste do labirinto em Y

Realizou-se o teste comportamental conforme descrito anteriormente no item 2.5.3.3 na página 17.

3.5.3.4 Teste do campo aberto

Realizou-se o teste comportamental conforme descrito anteriormente no item 2.5.3.4 na página 18.

3.5.3.5 Teste da Realocação de Objetos

Realizou-se o teste comportamental conforme descrito anteriormente no item 2.5.3.5 na página 19.

3.5.3.6 Teste do nado forçado

O procedimento utilizado neste teste foi previamente descrito por Porsolt e colaboradores em 1977 e previamente padronizado em nosso laboratório (PAMPLONA et al., 2010). Os camundongos foram colocados individualmente em cilindros de vidro individuais medindo 20 cm de altura e 14 cm de diâmetro preenchido até a metade com água mantida em temperatura controlada de 25 ± 1 °C. Foi realizado uma sessão de natação de 6 min. A duração total do comportamento de imobilidade foi aferida manualmente e continuamente durante todo o período da sessão. O animal foi considerado imóvel quando flutuava ou fazia apenas os movimentos necessários para manter a sua cabeça acima do nível da água (CHEN et al., 2015).

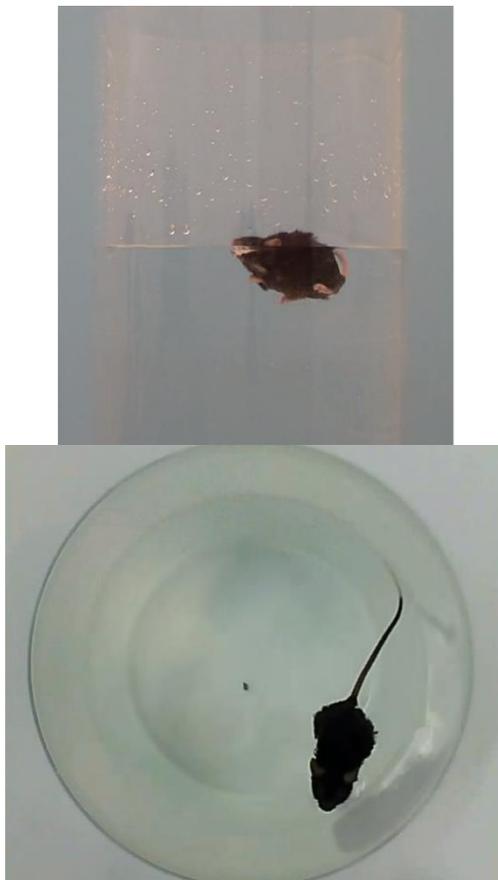


Figura 25. Teste do nado forçado utilizado para avaliação do tempo de imobilidade dos animais utilizado como parâmetro do comportamento do tipo depressivo. Fonte: acervo pessoal do autor.

3.5.4 Teste bioquímico

3.5.4.1 Imunodeteção de proteínas: Western blotting

Realizou-se a imunodeteção de proteínas no estriado dos camundongos, conforme descrito anteriormente no item 2.5.5.1 na página 23, utilizando os anticorpos primários anti-TH, anti- AT₁ e anti- AT₂.

3.5.5 Medidas fisiológicas

3.5.5.1 Pletismografia de cauda

Realizou-se o teste da pletismografia de cauda em uma medida basal, 5, e 20 dias após a administração i.n. de MPTP conforme descrito anteriormente no item 2.5.4.1 na página 22.

3.5.5.2 Medidas de consumo hídrico e diurese

Os animais foram colocados em caixas metabólicas em duplas para uma medida basal, 5, 12 e 20 dias após a administração intranasal de MPTP, sendo que durante um período de 12 horas o consumo de água e o volume de urina foram medidos.

3.5.5.3 Análise da concentração de eletrólitos presentes na urina

Para a medida dos eletrólitos urinários, colheu-se a urina conforme descrito no item 3.5.4.2, em uma medida basal, 5, 12 e 20 dias após a administração i.n. de MPTP. A concentração dos eletrólitos foi mensurada através do aparelho Ionmax[®], pela técnica de íon seletivo, conforme instruções do fabricante.

3.5.6 Análise estatística

De modo geral utilizou-se a análise estatística de variância (ANOVA) fatorial seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e o nível de significância aceito como indicativo de diferença entre os grupos foi de $P \leq 0.05$. Utilizou-se a análise de variância com medidas repetidas quando apropriado. Os resultados obtidos no teste do escore neurológico de severidade foram representados como medianas \pm intervalo interquartil, onde a comparação das medianas foi realizada através do teste de Mann-Whitney U. Todas as análises foram realizadas com o software Statistica 7[®]. E O teste “t” de *student* foi utilizado para a avaliação se o percentual de tempo explorando o objeto realocado diferia significativamente de um valor teórico de 50%. Todo os gráficos contidos nessa tese foram obtidos com a utilização do software GraphPad Prism 5[®].

3.5.7 Desenho experimental

O desenho experimental ilustrado na figura 26, foi utilizado para testar a hipótese neuroprotetora do tratamento com losartana 50 mg/kg sobre as alerações induzidas pela neurotoxina MPTP em camundongos.

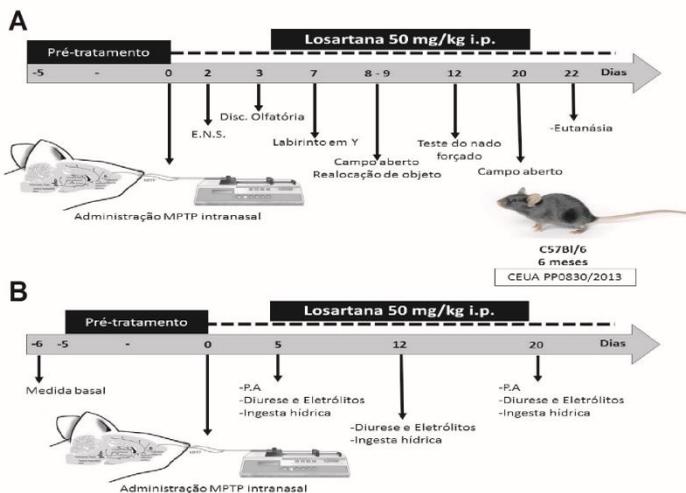


Figura 26. Segundo protocolo experimental. (A) Camundongos C57Bl/6 machos com 6 meses de idade foram submetidos ao pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) durante 5 dias e durante todo o restante do protocolo experimental, todos os dias ao final do ciclo claro do biotério. A administração i.n. de MPTP ocorreu uma única vez realizada 5 dias após o início da administração de losartana. Durante o período do 2º até o 22º dia do protocolo experimental, os animais foram avaliados nos testes comportamentais do escore neurológico de severidade (ENS), discriminação olfatória, labirinto em Y, campo aberto, realocação de objeto, teste do nado forçado e aferição da pressão arterial sistólica (PA). Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e o corpo estriado foi dissecado e congelado para a posterior avaliação da imunodeteção de proteínas de interesse pela técnica de *western blotting*. (B) Medidas da pressão arterial sistólica (PA), diurese e ingestão hídrica foram realizadas antes do início do tratamento (medida basal), 5, 12 e 20 dias após a administração de MPTP.

3.6 Resultados

3.6.1 Escore neurológico de severidade

Quando avaliados no ENS, os camundongos do grupo controle/MPTP apresentaram prejuízos neurológicos gerais indicados por uma maior pontuação na escala quando comparado ao grupo controle/veículo, como pode ser observado na Figura 27 [Mann-Whitney $U = 15$ ($P \leq 0,05$)]. O pré-tratamento com a losartana mostrou-se eficaz em

proteger os animais do aparecimento dos prejuízos neurológicos induzidos pelo MPTP, indicado pelo menor escore quando comparado ao grupo MPTP/veículo [Mann-Whitney $U = 12$ ($P \leq 0,05$)], e apresentando escores semelhantes ao grupo controle [Mann-Whitney $U = 31$ ($P \geq 0,05$)].

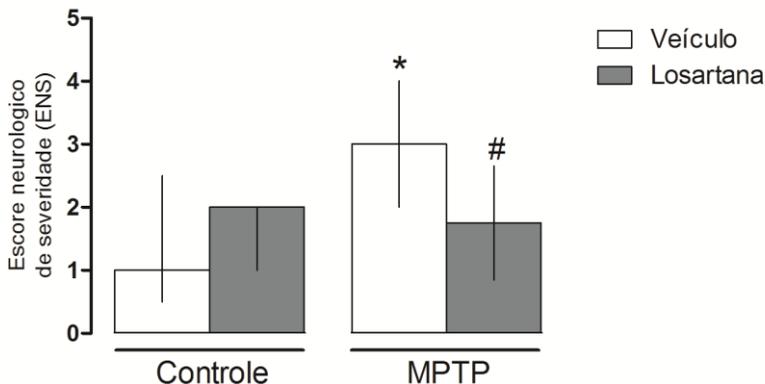


Figura 27. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) sobre o estado neurológico geral de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliados no teste do Escore Neurológico de Severidade, realizado sete (7) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados estão representados pela mediana e intervalo interquartil. Um maior escore indica um maior comprometimento neurológico, até o máximo de 10 pontos. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle/veículo e # $P < 0,05$ comparado ao grupo controle/veículo (teste de Mann-Whitney U) ($n = 8-10/\text{grupo}$).

3.6.2 Discriminação olfatória

Três dias após a administração i.n. do MPTP os animais foram avaliados no teste da discriminação olfatória. O controle locomotor do teste, representado pelo número de cruzamentos entre os compartimentos familiar e não familiar, demonstra que os animais não apresentam comprometimento locomotor, não havendo diferenças significativas entre os grupos [$F_{(1,36)} = 0,42$, ($P > 0,05$)] (Figura 28A). Os camundongos do grupo controle/veículo [$t = 1,52$ $P \leq 0,05$], controle/losartana [$t = 2,45$ $P \leq 0,05$] e MPTP/losartana [$t = 5,96$ $P \leq 0,05$] foram capazes de discriminar entre os dois ambientes no teste da discriminação olfatória (Figura 28B). Os camundongos do grupo MPTP/veículo não foram capazes de discriminar entre os dois ambientes [$t = 0,82$ $P \leq 0,05$], não

havendo diferenças entre os tempos de investigação nos ambientes familiar e não familiar (Figura 28B).

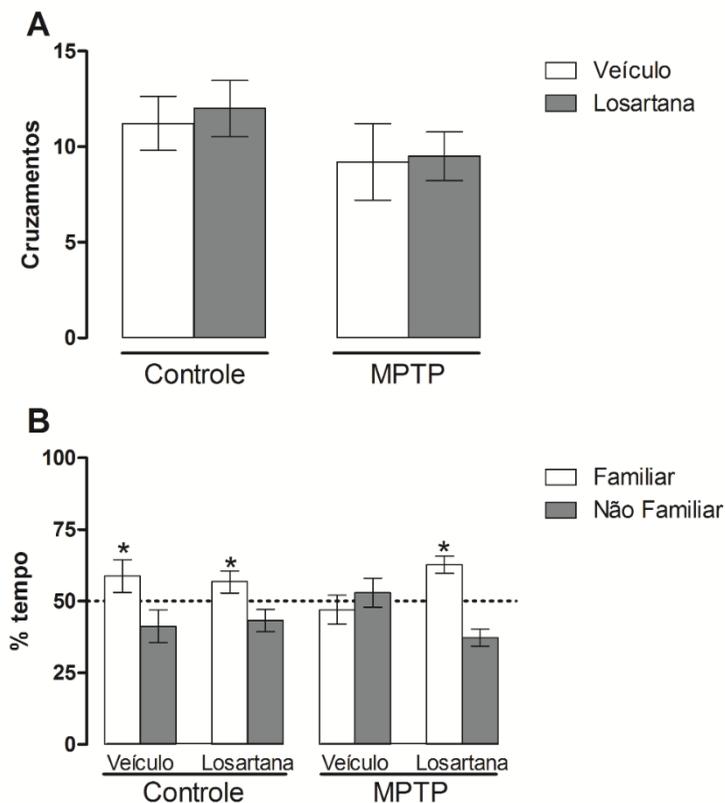


Figura 28. Efeitos do tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) e do tratamento i.n. com MPTP (1 mg/narina) sobre a discriminação olfatória de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada oito (8) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. (A) As barras verticais representam o número total de cruzamentos entre os ambientes familiar e não familiar. (B) As barras verticais representam o percentual do tempo de permanência dos camundongos no ambiente familiar (barras brancas) e não familiar (barras cinzas). * $P < 0,05$ comparado ao percentual do tempo despendido no ambiente não familiar (Teste "t" de student) (n = 9-11/grupo).

3.6.3 Labirinto em Y

A Figura 29 ilustra o efeito do pré-tratamento com losartana e do tratamento i.n. com MPTP sobre o desempenho dos animais no teste do labirinto em Y, usado para investigar possíveis prejuízos na memória de trabalho. Com relação ao parâmetro locomotor do teste, representado pelo número total de entradas nos braços do labirinto em Y, a ANOVA fatorial não indicou diferenças significantes entre os grupos [$F_{(1,31)}=0,29$ ($P \geq 0,05$)] (Figura 29A). Entretanto, a ANOVA fatorial indicou um efeito significativo para a interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F_{(1,31)}=6,07$ ($P \leq 0,05$)]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que ocorreu um prejuízo na memória de trabalho no grupo MPTP/veículo indicado pela redução no percentual de alternâncias corretas no labirinto em Y em comparação ao grupo controle ($P \leq 0,05$). Além disso, o pré-tratamento com losartana promoveu um aumento no percentual de alternâncias corretas no labirinto em Y no grupo MPTP/losartana em relação aos animais do grupo MPTP/veículo [*post-hoc* Newman-Keuls ($P \leq 0,05$)] (Figura 29B).

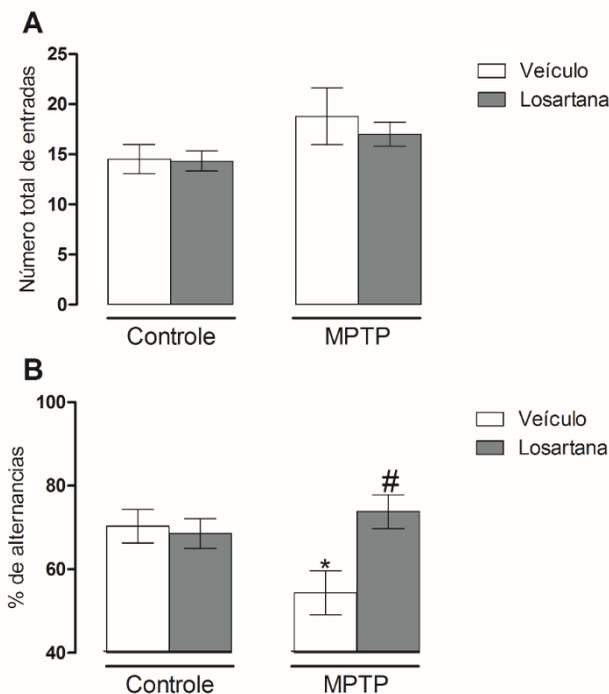


Figura 29. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p.) e da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre a memória de trabalho de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliados no teste do labirinto em Y, realizado doze (12) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. (A) As barras verticais representam o número total de entradas nos braços do labirinto. (B) As barras verticais representam o percentual de alternâncias corretas dos camundongos no labirinto. * $P \leq 0,05$ comparado ao percentual de alternâncias corretas em relação aos respectivos animais controle e # $P \leq 0,05$ comparado ao percentual de alternâncias corretas em relação ao grupo MPTP/veículo (ANOVA fatorial seguida do teste post-hoc Newman-Keuls) (n= 8-9/grupo).

3.6.4 Teste do campo aberto I

A Figura 30 ilustra os resultados do teste do campo aberto (duração de 5 min), que foi realizado oito (8) dias após a administração i.n. de MPTP. A ANOVA fatorial não revelou efeito significativo dos fatores analisados e da sua interação [ANOVA fatorial ($F_{(1,42)}=0,28$, $P \geq 0,05$)].

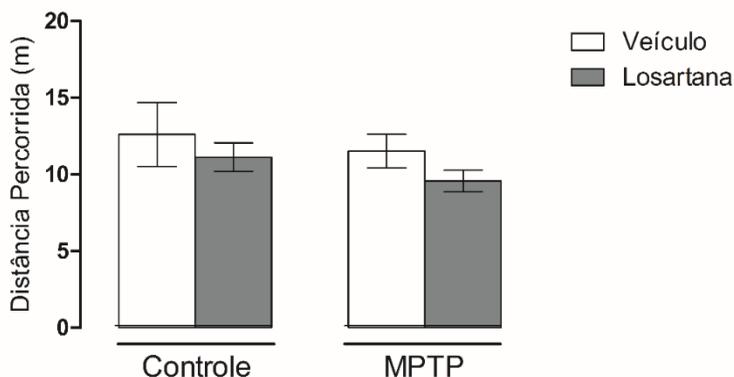


Figura 30. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre a atividade locomotora espontânea de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada no teste do campo aberto, realizado doze (12) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados são representados pela média \pm E.P.M. As barras representam a distância total percorrida em metros durante 5 minutos ($n= 8-9$ /grupo).

3.6.5 Teste da realocação de objetos

Como ilustrado na Figura 31, os camundongos pertencentes ao grupo Controle/veículo [$t=3,24$ ($P \leq 0,05$)], Controle/losartana [$t=9,44$ ($P \leq 0,05$)] e MPTP/losartana [$t=4,93$ ($P \leq 0,05$)] investigaram o objeto realocado por um tempo significativamente maior do que o objeto que permaneceu na mesma posição, como indicado pelo aumento significativo no índice de localização em comparação com 50% (valor teórico). Por outro lado, os camundongos do grupo MPTP/veículo não foram capazes de identificar a alteração espacial dos objetos no campo aberto [$t=0,59$ ($P \geq 0,05$)].

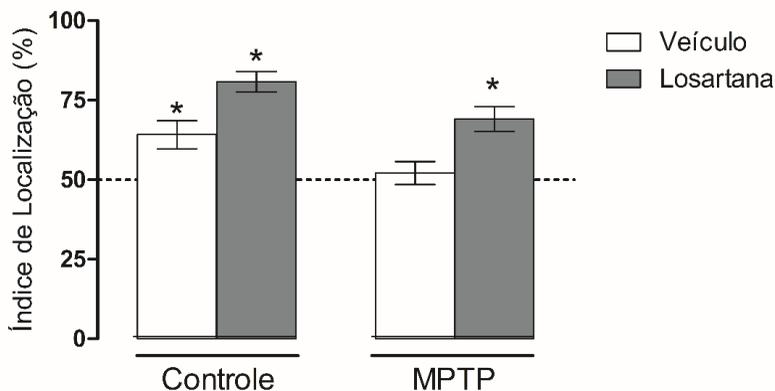


Figura 31. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e da administração i.n. de MPTP (1mg/narina) sobre a memória espacial de curto prazo de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada no teste de realocação de objetos, realizado treze (14) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados são representados pela média \pm E.P.M. Índice expresso em percentual do tempo de investigação entre os objetos (tempo de investigação objeto realocado \times 100 / tempo de investigação no objeto realocado + tempo de investigação no objeto não realocado). * $P < 0,05$ comparado aos 50% do tempo total de investigação (n= 8-9/grupo).

3.6.6 Teste do nado forçado

A Figura 32 ilustra o efeito do pré-tratamento com a losartana e do tratamento i.n. com MPTP sobre o tempo de imobilidade dos animais avaliada no teste do nado forçado como um indicativo de comportamento do tipo depressivo. A ANOVA fatorial não revelou efeito significativo dos fatores analisados e da sua interação [$F_{(1,39)}=0,02$ ($P \geq 0,05$)].

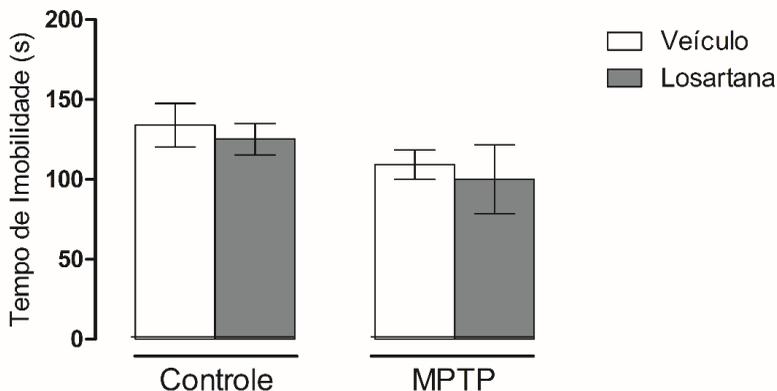


Figura 32. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) no comportamento do tipo depressivo de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliado no teste do nado forçado, realizado dezessete (17) dias após o início do tratamento com losartana. Os dados são representados pela média \pm E.P.M. As barras representam o tempo total de imobilidade em segundos dos animais avaliados por 6 min (n=8-12/grupo).

3.6.7 Teste do campo aberto II

A Figura 33 ilustra o efeito do pré-tratamento com a losartana e do tratamento i.n. com MPTP sobre o desempenho dos animais no teste do campo aberto avaliado durante 60 min. A ANOVA fatorial indicou um efeito significativo da interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F_{(1,41)}=4,98$ ($P \leq 0,05$)]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls indicou um aumento na distância total percorrida no grupo MPTP/veículo em comparação ao grupo controle/veículo e que o pré-tratamento com a losartana promoveu uma redução na distância total percorrida do grupo MPTP/losartana em relação ao grupo MPTP/veículo ($^{\#}P \leq 0,05$).

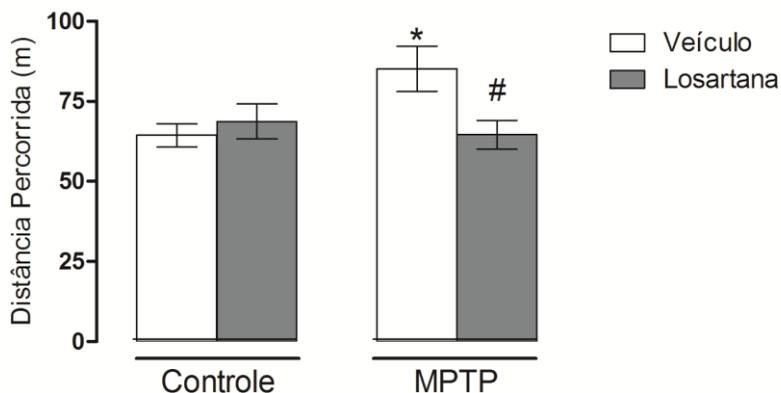


Figura 33. Efeitos do pré-tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p) e da administração i.n. de MPTP (1mg/narina) na atividade locomotora espontânea de camundongos C57Bl/6 com 6 meses de idade avaliada no teste do campo aberto 25 dias após o início do tratamento com a losartana. Os dados são representados pela média \pm E.P.M. As barras representam a distância total percorrida em metros durante 60 minutos. * $P \leq 0,05$ ao respectivo grupo controle e # $P \leq 0,05$ comparado ao grupo MPTP/veículo (ANOVA fatorial seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls) (n= 8-9/grupo).

3.6.8 Níveis de tirosina hidroxilase e dos receptores AT_1 e AT_2 no estriado

A ANOVA fatorial indicou um efeito significativo para o fator pré-tratamento [$F_{(1,27)}=10,94$ ($P \leq 0,05$)] e para o fator tratamento [$F_{(1,27)}=29,32$ ($P \leq 0,05$)], mas não para a interação entre os fatores [$F_{(1,27)}=0,23$ ($P \geq 0,05$)], nos os níveis estriatais de TH. O teste *post-hoc* indicou que ocorreu uma redução significativa nos níveis de TH no grupo MPTP/veículo comparado com o respectivo grupo controle e que o pré-tratamento com a losartana previniu a redução de TH no estriado comparado com o grupo MPTP/veículo. Ainda, a ANOVA fatorial não revelou efeitos significantes para o fator pré-tratamento [$F_{(1,28)}=0,32$ ($P \geq 0,05$)] e para o fator tratamento [$F_{(1,28)}=3,70$ ($P \geq 0,05$)] nos níveis dos receptores AT_1 , tampouco para os níveis dos receptores AT_2 , fator pré-tratamento [$F_{(1,20)}=1,05$ ($P \geq 0,05$)] e para o fator tratamento [$F_{(1,20)}=0,19$ ($P \geq 0,05$)].

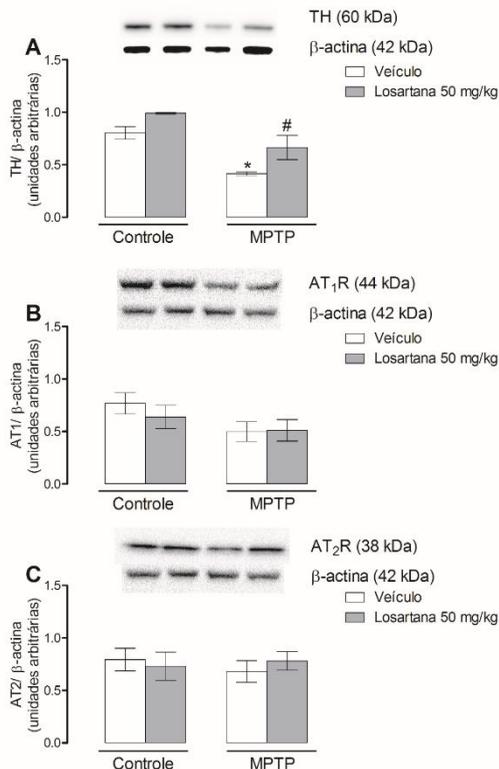


Figura 34. Efeitos do pré-tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p) e da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o imunoconetúdo da enzima tirosina hidroxilase (TH) e na densidade dos receptores AT-1 e AT-2 no corpo estriado de camundongos C57BL6 avaliados através do ensaio de *western blotting*. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. As barras verticais representam os níveis das proteínas em unidades arbitrárias. (A) Níveis da enzima tirosina hidroxilase (TH). (B) Densidade dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT₁R) e (C) densidade dos receptores de angiotensina II do tipo 2 (AT₂R). * $P \leq 0,05$ ao respectivo grupo controle e # $P \leq 0,05$ comparado ao grupo MPTP/veículo (ANOVA fatorial seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls) (n= 5-7/grupo).

3.6.9 Pressão arterial sistólica

A Figura 35 ilustra o efeito do pré-tratamento com losartana e do tratamento i.n. com MPTP sobre a pressão arterial sistólica. A ANOVA fatorial indicou um efeito significativo do fator repetição [$F_{(2,34)}=10,28$ ($P \leq 0,05$)], efeito não observado na interação entre os fatores pré-

tratamento e tratamento [$F_{(2,34)}=1,05$ ($P \geq 0,05$)]. A análise *post-hoc* não evidenciou diferenças entre os grupos experimentais.

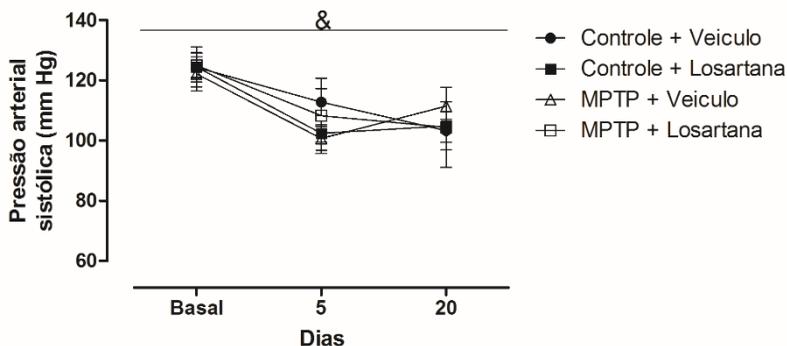


Figura 35. Efeitos do pré-tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1 mg/narina) sobre a pressão arterial sistólica dos animais. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. Os pontos que interconectam a linha representam a medida da pressão sanguínea sistólica. $\&P \leq 0,05$ em relação ao efeito repetição (ANOVA fatorial seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls) ($n=4$ /grupo).

3.6.10 Ingestão hídrica e diurese

A Figura 36 ilustra o efeito do pré-tratamento com a losartana e do tratamento i.n. com MPTP sobre a ingestão hídrica (A) e diurese (B) dos camundongos. A ANOVA fatorial indicou um efeito significativo do fator repetição no consumo de água [$F_{(3,38)}=10,74$ ($P \leq 0,05$)], efeito não observado na interação entre os fatores pré-tratamento e procedimento [$F_{(3,38)}=1,59$ ($P \geq 0,05$)]. A análise *post-hoc* evidenciou diferenças entre o grupo MPTP/veículo e Controle/veículo no 20º dia experimental. A ANOVA fatorial também indicou um efeito significativo do fator repetição na diurese dos animais [$F_{(3,54)}=10,74$ ($P \leq 0,05$)].

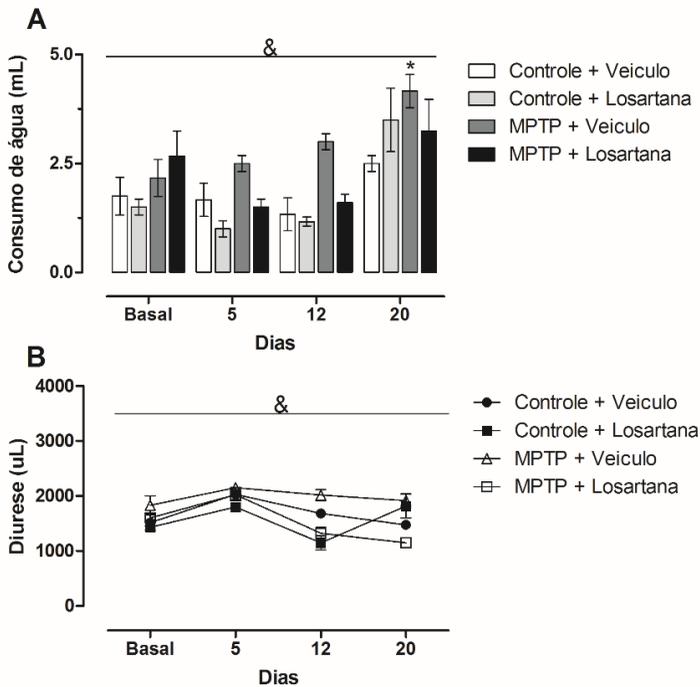


Figura 36. Efeitos do pré-tratamento com a losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1mg/narina) sobre a ingestão hídrica e diurese dos animais. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. (A) As barras verticais representam a ingestão de água em mililitros (mL). (B) Os pontos que interconectam a linha representam a medida da quantidade total de urina em microlitros (ul) durante 12h. $\&P \leq 0,05$ em relação ao efeito repetição (ANOVA fatorial seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls) (n=4-6/grupo).

3.6.11 Níveis de eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^-) presentes na urina dos camundongos tratados com MPTP e losartana

A Figura 37 ilustra o efeito do pré-tratamento com a losartana e do tratamento i.n. com MPTP sobre a concentração de eletrólitos presentes na urina dos camundongos. A ANOVA fatorial indicou ausência de diferenças significativas entres os grupos experimentais durante o período de análise para a concentração dos íons (A) Na^+ [$F_{(3,21)}=0,62$ ($P \geq 0,05$)] e (C) Cl^- [$F_{(3,21)}=0,45$ ($P \geq 0,05$)] presentes na urina dos camundongos. A ANOVA fatorial indicou um efeito significativo do fator repetição para a concentração dos ions K^+ presente na urina dos animais [$F_{(3,21)}=3,60$ ($P \leq 0,05$)], efeito não observado na interação entre

os fatores pré-tratamento e procedimento [$F_{(3,21)}=1,99$ ($P \geq 0,05$)]. A análise *post-hoc* não evidenciou diferenças entre os grupos experimentais, quando analisado o dia da medida.

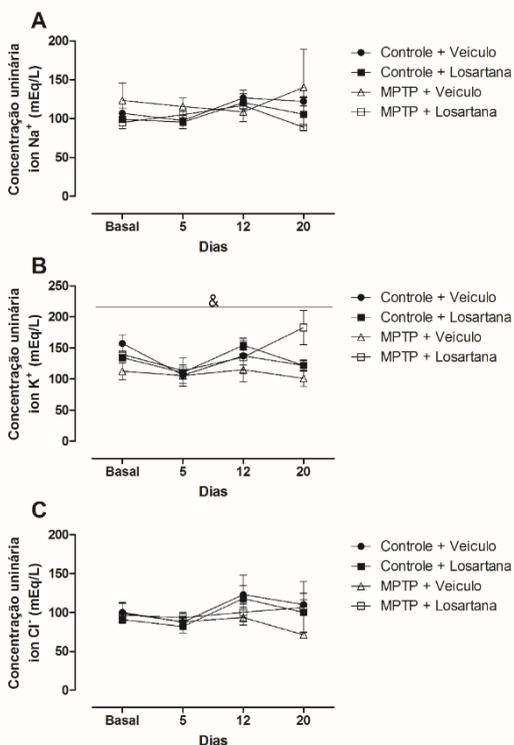


Figura 37. Efeitos do pré-tratamento com losartana (50 mg/kg, i.p) e do tratamento intranasal com MPTP (1mg/narina) sobre os níveis de eletrólitos presentes na urina dos camundongos. Os dados estão representados pela média \pm E.P.M. Os pontos que interconectam a linha representam a concentração de eletrólitos em mEq/L. &P $\leq 0,05$ em relação ao efeito repetição (ANOVA fatorial seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls) (n= 2-3/grupo).

3.7 Discussão

A hipótese deste capítulo foi baseada em evidências recentes que demonstram o potencial terapêutico do sistema renina-angiotensina em promover neuroproteção em diferentes modelos animais da DP. Nossos resultados demonstraram de maneira inédita que os prejuízos não motores induzidos pela administração i.n. de MPTP em camundongos foram prevenidos pelo tratamento com a losartana, um antagonista dos receptores de angiotensina II do tipo 1.

Para mimetizarmos as alterações pré-motoras da DP, utilizamos o modelo da administração i.n. do MPTP em camundongos C57Bl/6 de 6 meses de idade, previamente padronizado em nosso laboratório, demonstrando que os animais dessa idade apresentam maior susceptibilidade à neurotoxina pela via i.n. (PREDIGER et al., 2010). Este modelo é útil para a avaliação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dos sintomas não motores da DP (MATHEUS et al., 2012; PREDIGER et al., 2010).

No SNC, os receptores para angiotensina II (AT₁ e AT₂) apresentam uma maior densidade no corpo estriado e na substância negra, tanto em humanos quanto em animais de laboratório (LABANDEIRA-GARCÃA et al., 2014). Em pacientes parkinsonianos, os níveis dos receptores AT₁ estão reduzidos em áreas dopaminérgicas após o processo neurodegenerativo, indicando que este subtipo de receptor parece estar presente em neurônios dopaminérgicos (VILLAR-CHEDA et al., 2010). No entanto, no presente estudo, utilizando o modelo da administração i.n. do MPTP, não foram observadas alterações significativas nos níveis dos receptores AT₁ e AT₂ no estriado. Estes resultados contrastam com trabalhos prévios da literatura utilizando outros modelos animais da DP (VILLAR-CHEDA et al., 2010). Estas diferenças podem ser justificadas pelo fato do modelo da administração i.n. do MPTP mimetizar as fases iniciais da DP, onde o processo neurodegenerativo ainda não está acentuado (AGUIAR; PREDIGER, 2012).

A barreira hematoenéfica está diretamente relacionada com o controle da homeostase e o controle da passagem de substâncias para o SNC. Diversos estudos vêm demonstrando que disfunções na BHE são fatores de predisposição para inúmeras doenças neurológicas, incluindo a DP (DESAI et al., 2007). O sistema renina-angiotensina apresenta um papel fundamental na formação da BHE, sendo que um estudo epidemiológico demonstrou que a utilização de inibidores da ECA no primeiro trimestre da gestação estaria relacionado a má formação da BHE (COOPER et al., 2006). Ainda, Wosik e colaboradores demonstraram através de experimentos *in vivo* e *in vitro* que a angiotensina II, produzida

nos astrócitos via receptores AT_1 , levaria a fosforilação e desfosforilação de ocludinas, o que por sua vez levaria a mobilização de lipídios de membrana que controlariam a entrada de substâncias no SNC (WOSIK et al., 2007). Estes resultados são um pouco contraditórios, uma vez que o bloqueio da produção de angiotensina II levaria a redução de edema em modelos de acidentes vasculares cerebrais e que a utilização de antagonistas dos receptores AT_1 reduzem a permeabilidade da BHE, sem alterar a expressão de ocludinas (FLEEGAL-DEMOTTA; DOGHU; BANKS, 2009; LOU et al., 2004)

Devido a sua alta lipossolubilidade, o MPTP se difunde rapidamente pelas barreiras celulares sendo convertido no SNC a sua forma tóxica MPP^+ principalmente em astrócitos através da ação da enzima MAO-B. O MPP^+ é uma toxina que possui uma toxicocinética rápida e eficaz, levando a morte neuronal (KADAR et al., 2014). Como observado neste estudo, esta toxina é capaz de gerar comprometimentos neurológicos, disfunções olfatórias e cognitivas, além de uma redução nos níveis de TH, indicativo de morte neuronal. Resultados prévios da literatura demonstram que a losartana não interfere com a cinética de biotransformação do MPTP, permitindo que este seja convertido em MPP^+ e exerça a sua toxicidade sobre neurônios dopaminérgicos (GRAMMATOPOULOS et al., 2007).

O pré-tratamento com losartana foi capaz de prevenir os prejuízos olfatórios induzidos pela administração i.n de MPTP. Os sintomas olfatórios, de acordo com o estadiamento proposto por Braak, apareceriam logo no início do processo neurodegenerativos, no estágio 1 ou 2 pré-sintomáticos, podendo anteceder em até 20 anos os sintomas motores da DP (BRAAK et al., 2004). Em particular, o bulbo olfatório recebe projeções noradrenérgicas do locus cerúleos, e a neurotransmissão noradrenérgica possui um papel relevante na habituação e na discriminação de odores em roedores (GUÉRIN et al., 2008). Foi demonstrado que lesões induzidas especificamente nas inervações noradrenérgicas induzem prejuízo na habituação e discriminação de odores, e que a reposição de noradrenalina nestes animais é capaz de reverter estes prejuízos (GUÉRIN et al., 2008; YUAN et al., 2003).

Estudos envolvendo o sistema nervoso periférico demonstram a estreita relação entre os sistemas renina-angiotensina e noradrenérgico, onde, de maneira geral, a Ang II facilita a liberação de noradrenalina através dos receptores AT_1 (STORY; ZIOGAS, 1987; SUZUKI et al., 1992). Portanto, extrapolando os mecanismos do sistema nervoso periférico para o SNC, podemos sugerir que os resultados obtidos no nosso estudo em que a losartana preveniu o prejuízo olfatório induzido

pelo MPTP intranasal, estaria envolvendo esta modulação do sistema noradrenérgico. Alternativamente, os efeitos benéficos do tratamento com a losartana sobre a função olfatória dos animais administrados com MPTP poderia ser explicada por uma proteção contra a morte dos neurônios dopaminérgicos no bulbo olfatório, uma vez que estes também participam do controle de funções olfatórias (PREDIGER et al., 2010). Experimentos adicionais de dosagem dos neurotransmissores dopamina e noradrenalina no bulbo olfatório de camundongos tratados com losartana e MPTP estão em desenvolvimento em nosso laboratório e poderão esclarecer estes mecanismos.

Adicionalmente, o pré-tratamento com losartana foi capaz de prevenir o prejuízo das memórias de trabalho e espacial avaliadas, respectivamente, nos testes do labirinto em Y e realocação de objetos, além de evitar o desenvolvimento de hiperlocomoção, quando avaliados no teste do campo aberto. Como discutido no capítulo anterior, o sistema renina-angiotensina possui um papel importante nos processos de aprendizado e memória. Lazaroni e colaboradores demonstraram que a deleção genética ou o bloqueio farmacológico dos receptores MAS causariam prejuízo na tarefa do reconhecimento de objeto. Ainda, o bloqueio farmacológico dos receptores AT₁ foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico nesta tarefa nos camundongos knockouts para o receptor MAS, e que antagonistas AT₂ não apresentavam esta capacidade de reversão (LAZARONI et al., 2012).

Outros componentes do sistema renina-angiotensina também parecem ter papel importante nos processos de aprendizado e memória, uma vez que a angiotensina IV possui efeitos pró-cognitivos nos testes da esquiiva ativa do tipo *step-down* e no reconhecimento de objetos, sendo que este efeito é revertido pela administração de antagonistas dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁₋₄ (BRASZKO, 2009). Estes resultados indicam que a inativação dos receptores IRAP pela angiotensina IV pode levar a uma modulação do sistema dopaminérgico, levando a um aumento na liberação de dopamina, mas o mecanismo pelo qual ocorre esta interação entre os sistemas ainda não foi elucidado (BRASZKO, 2004, 2010). Também já foi demonstrado que a administração de angiotensina II aumenta o comportamento estereotipado em roedores, por promover aumento da liberação de dopamina no SNC quando administrado pela via intracerebroventricular (BROWN et al., 1996). Além disso, Lin e colaboradores demonstram em um estudo epidemiológico que polimorfismos nos genes da ECA representam fatores de risco para o desenvolvimento da DP, além de aumentarem os

casos de psicose e alucinações associados ao tratamento com a L-dopa (LIN et al., 2007).

Baseados nisso, um dos possíveis mecanismos pelo qual a losartana estaria revertendo os prejuízos nos processos mnemônicos testados estaria em modular a neurotransmissão dopaminérgica. Diversos grupos de pesquisa têm demonstrado o papel da neurotransmissão dopaminérgica em processos de aprendizado e memória, onde a redução dos níveis dopamina reduziria os processos de neuroplasticidade no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo (JAY et al., 2004; ROSSATO et al., 2009).

Como podemos observar, o MPTP foi capaz de induzir a morte de neurônios dopaminérgicos, evidenciado pela redução dos níveis de TH no estriado dos animais, sem afetar os níveis dos receptores AT₁ e AT₂ nesta região. Ainda, a losartana foi capaz de prevenir esta redução. Ademais, observamos um aumento nos níveis de TH nos animais não lesionados com MPTP e tratados com losartana, indicando um possível efeito modulatório da losartana na síntese da enzima TH.

O efeito do tratamento sobre os níveis de TH são contraditórios, uma vez que estudos prévios demonstram que o bloqueio crônico dos receptores AT₁ não afeta a transcrição de TH no sistema nervoso periférico (JEZOVA et al., 2003). Além disso, a angiotensina II, quando administrada diretamente no SNC de ratos, é capaz de aumentar a transcrição de TH via receptores AT₁ (YU et al., 1996). Porém, são necessários estudos adicionais para uma melhor compreensão se o bloqueio dos receptores AT₁ pela losartana poderia deslocar a angiotensina II para atuar em outros receptores do sistema renina-angiotensina, e assim, promover esta modulação na transcrição da TH.

Além disso, outro sistema de neurotransmissão que apresenta um papel importante nos processos de aprendizado e memória é o glutamatérgico, principalmente através da sua atuação nos receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012). Existem evidências respaldando que o sistema glutamatérgico também sofreria influência do sistema renina-angiotensina, como demonstrado por Wayner (2001) e Davis (2006), onde a angiotensina IV facilitaria a formação de LTP (um processo sabidamente dependente da ativação dos receptores NMDA) (DAVIS et al., 2006; WAYNER et al., 2001).

Foi observado que o MPTP induziu hiperlocomoção nos animais avaliados durante 60 minutos no teste do campo aberto após 20 dias da sua administração. Inicialmente este teste foi proposto buscando avaliar possíveis prejuízos de habituação, onde animais com prejuízos de

memória espacial não conseguiriam formar um mapa espacial do aparato do campo e apresentariam um comportamento exploratório maior no decorrer do teste. No entanto, devido a problemas técnicos com a gravação dos experimentos, não podemos afirmar que esta hiperlocomção está associada com o prejuízo deste tipo de memória. Além disso, estudos prévios na literatura demonstram que o MPTP pode induzir hiperlocomção, e este efeito estaria relacionado com uma redução dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal (ROUSSELET et al., 2003).

Diferentes grupos de pesquisa vêm demonstrado novas perspectivas sobre os possíveis mecanismos pelos quais os antagonistas dos receptores AT₁ exercem seus efeitos neuroprotetores. Wang e colaboradores demonstraram que o bloqueio desses receptores é capaz de inibir a excitotoxicidade glutamatérgica, através da ação direta sobre os receptores AT₁, uma vez que a ativação de receptores NMDA é capaz de aumentar a expressão dos receptores AT₁ e reduzir a expressão dos receptores AT₂ (BENICKY et al., 2011a; WANG et al., 2014).

O bloqueio dos receptores AT₁ também induz efeitos antiinflamatórios pronunciados. Como demonstrado por Benicky e colaboradores, o aumento nos níveis de mediadores inflamatórios após a administração de lipopolisacarídeo (LPS), um modelo desencadeador de neuroinflamação, foi prevenido pelo tratamento com antagonistas dos receptores AT₁ (BENICKY et al., 2011b). O processo inflamatório induzido por LPS é capaz de aumentar a expressão de receptores AT₁, por outro lado, a utilização de antagonistas deste receptor é capaz de inibir a transcrição de CD4, bem como inibir a ação de receptores do tipo Toll 4 e interleucinas 1 β , que por consequência acaba reduzindo a formação de ciclooxigenase 2, factor nuclear kappa B (NF- κ B), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6, que por fim acabam reduzindo os processos de estresse oxidativo e inflamatórios (BENICKY et al., 2011b; PANG et al., 2012; SAAVEDRA, 2012).

O MPTP promove a morte dos neurônios dopaminérgicos principalmente através da indução de estresse oxidativo e inibição do complexo I mitocondrial (PREDIGER et al., 2010). No presente estudo, a redução nos níveis estriatais de TH induzidos pelo MPTP foi protegida pelo pré-tratamento com a losartana. Esses resultados podem estar relacionados a uma inibição da ativação do complexo NADPH-oxidase, que gera radicais livres, induzindo estresse oxidativo e neuroinflamação. Esse processo já foi demonstrado em um estudo *in vitro*, no qual a Ang II foi capaz de exacerbar os efeitos do MPTP ativando o complexo NADPH e a microglia, e a administração de um antagonista dos receptores AT₁ foi

capaz de inibir essa ativação (JOGLAR et al., 2009). Ademais, Sekar Sathiya e colaboradores demonstraram que os efeitos neuroprotetores mediados pelo bloqueio dos receptores AT₁, em um modelo utilizando doses mais elevadas de MPTP para indução de sintomas motores, era mediado pelo aumento de expressão de BDNF e GDNF e redução de GFAP no estriado e na SNpc dos animais (SATHIYA et al., 2013). Também foi demonstrado que o bloqueio dos receptores AT₁ ou ativação dos receptores AT₂ foi capaz de ativar os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ), e que seria também capaz de levar a efeitos neuroprotetores através da inibição de NADPH-oxidase (GARRIDO-GIL et al., 2012; WANG et al., 2014).

O tratamento com a losartana não alterou *per se* a locomoção dos animais avaliada no teste do campo aberto. Apesar do sistema apresentar um papel modulatório na liberação de dopamina, estudos revelam que não ocorrem diferenças significativas em tarefas do campo aberto e rotarod em animais tratados com antagonistas AT₁, sendo que os efeitos observados no ENS podem estar relacionados com o efeito neuroprotetor da losartana (TOTA et al., 2013; VILLAPOL et al., 2012).

A depressão afeta aproximadamente 40% dos pacientes Parkinsonianos (CUMMINGS, 1992). Os sintomas relacionados à depressão, como: anedonia, apatia e isolamento social, também são observados em modelos animais da DP, porém são dependentes do modelo da DP, dose da neurotoxina e da espécie do animal utilizada (OSSOWSKA; LORENC-KOCI, 2013). Além disso, estudos de coorte indicam que existe uma forte correlação entre polimorfismos nos receptores AT₁ e a depressão em humanos, além da interferência na resposta à antidepressivos (BONDY et al., 2005; SAAB et al., 2007).

No presente estudo usando o modelo da administração i.n. do MPTP foi incapaz de gerar este prejuízo nos camundongos avaliados no teste do nado forçado 12 dias após a sua administração. Resultados semelhantes já foram descritos pelo nosso grupo de pesquisa em ratos administrados com MPTP pela via i.n. na dose de 0,1 mg por narina (CASTRO et al., 2012). Por outro lado, quando utilizou-se a dose de 1 mg/narina de MPTP, foram observados comportamentos do tipo depressivos em ratos Wistar (MOREIRA et al., 2010), o que não foi observado em nossa análise utilizando camundongos C57Bl/6. Neste sentido, alguns estudos demonstram que o desenvolvimento de comportamentos do tipo depressivo em roedores estaria relacionado com a susceptibilidade genética de cada espécie e linhagem (HENN; VOLLMEYR, 2005).

De modo geral, o pré-tratamento com losartana e a administração de MPTP não foram capazes de alterar os parâmetros de ingesta hídrica e diurese, a PA, tampouco foram afetados os níveis de Na^+ , K^+ e Cl^- . É importante ser ressaltado que o tratamento diário com a losartana foi sempre realizado no final do ciclo claro do biotério (aproximadamente 18:00 h), para evitarmos o efeito agudo da administração do fármaco sobre os parâmetros comportamentais analisados.

O tratamento crônico com a losartana eleva os níveis de angiotensina II circulante, ativando indiretamente os outros receptores do sistema renina-angiotensina. É sabido que diante do desbalanço na ingesta de K^+ ou disfunções renais, o tratamento pode levar a efeitos adversos de hiperpotassemia. Além disso, é observado que a losartana pode induzir um aumento da excreção de urinária de Na^+ , K^+ e Cl^- em condições de baixa ingesta de sódio, ou aumento da excreção de K^+ em condições de alta ingesta de sódio em pacientes saudáveis, duas horas após a sua administração (BURNIER et al., 1993). Com isso, podemos supor que o tratamento i.n. com MPTP não prejudica a função renal e que os animais receberam uma dieta equilibrada, uma vez que não foram observadas diferenças significativas nos níveis de eletrólitos presentes na urina.

3.8 Conclusões

Em conjunto, os resultados deste capítulo fornecem a primeiras evidências pré-clínicas de que a losartana, um antagonista dos receptores AT_1 para angiotensina II, é capaz de prevenir as alterações não motoras, além do seu potencial neuroprotetor, em um modelo animal da DP. Estes resultados reforçam a ideia de que a modulação do sistema renina-angiotensina pode representar uma nova ferramenta terapêutica para o tratamento da DP. Contudo são necessários experimentos adicionais para elucidação dos mecanismos associados aos efeitos protetores da losartana neste modelo.

4 CAPÍTULO 3: A HETEROMERIZAÇÃO DOS RECEPTORES AT₁ E A_{2A} COMO UM NOVO ALVO FARMACOLÓGICO PARA DOENÇAS DO SNC

4.1 Introdução: Oligomerização de receptores acoplados à proteína G

Os receptores acoplados à proteína G (GPCR) representam uma grande família de receptores transmembranares que regulam uma diversidade de efeitos celulares em diferentes órgãos e tecidos, incluindo o SNC. Desde os anos 1980 são relatadas evidências da existência de unidades funcionais dos GPCRs, que eram maiores do que o previsto para unidades funcionais monoméricas (AVISSAR; AMITAI; SOKOLOVSKY, 1983). No entanto, apenas nos últimos 20 anos, com o avanço das técnicas de biologia molecular, foi descrito que receptores acoplados à proteína G, não apenas apresentam-se como entidades monoméricas, mas são capazes de interagir com outras proteínas em um evento denominado de oligomerização (MAGGIO; VOGEL; WESS, 1993). Os receptores oligomerizados, por sua vez, exercem suas funções como unidades fisiológicas com funções distintas dos receptores que o compõem isoladamente (SALAHPOUR; ANGERS; BOUVIER, 2000). Esta interação entre os GPCR pode levar a formação de homômeros (proteínas idênticas) ou heterômeros (proteínas distintas). Além disso, a oligomerização dos GPCRs não está restrita à formação de dímeros, mas também pode formar entidades com três proteínas ou mais (Figura 38).

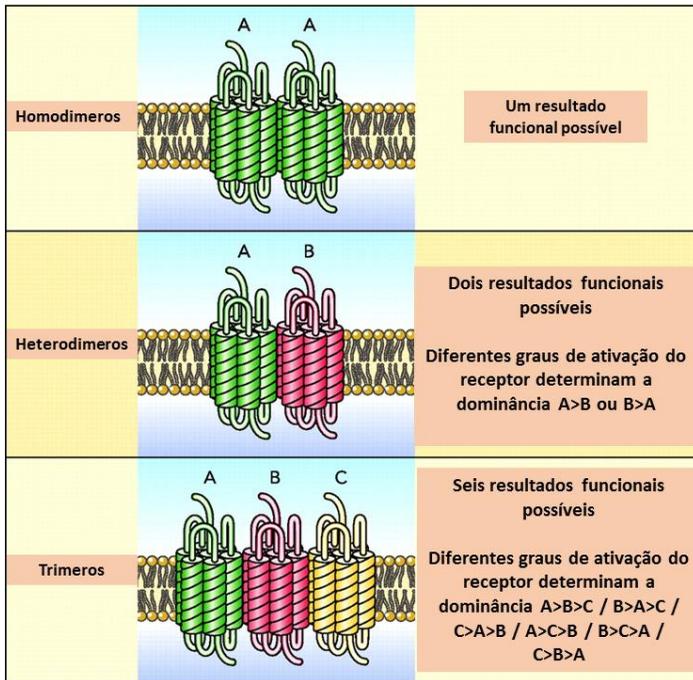


Figura 38. Esquema representativo dos diferentes tipos de oligomerização dos GPCRs. Figura adaptada de Fuxe e colaboradores, 2008. (FUXE et al., 2008)

O processo de oligomerização ocorre principalmente por meio de interações hidrófobas entre domínios iônicos extracelulares ou intracelulares dos receptores, e também por contato entre os domínios transmembranares. Do mesmo modo, a interação entre os GPCRs pode também ser mediada por proteínas do citoesqueleto, que atuam como pontes entre as duas proteínas oligoméricas (FUXE et al., 2008; SALAHPOUR; ANGERS; BOUVIER, 2000). Além disso, foi identificada a influência de certos microdomínios lipídicos da membrana, que são capazes de modular a fluidez membranar e favorecer a formação de oligômeros (LINGWOOD; SIMONS, 2010; SALON; LODOWSKI; PALCZEWSKI, 2011). Finalmente, algumas proteínas citosólicas podem também participar na oligomerização. Estas proteínas fornecem uma estrutura necessária para a formação de um complexo multi-proteína (BOUVIER, 2001; FUXE et al., 2008; SALAHPOUR; ANGERS; BOUVIER, 2000).

4.2 Oligomerização de GPCRs como alvo farmacológico

É crescente o número de trabalhos que relatam a funcionalidade dos complexos oligoméricos dos GPCRs. No entanto, a reprodutibilidade e a interpretação dos dados variam entre diferentes grupos de pesquisa. Atualmente, aproximadamente 25% de todos os alvos para fármacos no genoma humano são GPCRs (OVERINGTON; AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006). Como descrito anteriormente, pensava-se que os GPCRs eram apenas unidades monoméricas, capazes de ativar uma única via de sinalização. No entanto, tornou-se cada vez mais evidente que os GPCRs são capazes de formar oligômeros, sendo que a resposta celular desencadeada é dependente do complexo oligomérico formado (FERRÉ, 2015). Isso significa que estes processos dependem das vias de sinalização celular que estão sendo recrutadas, sendo que esses sinais podem ser integrados entre si para modular uma determinada resposta celular, como exemplificado abaixo.

Alguns destes processos estão melhor elucidados, como o processo de formação de uma via de sinalização distinta, como no caso da formação de oligômeros entre os receptores D_1 e D_2 para dopamina. Classicamente, os receptores D_1 ativam a via da adenilato ciclase, através da ativação da proteína $G\alpha_s$. Os receptores D_2 inibem a adenilato ciclase através da ativação da proteína $G\alpha_i$. No entanto, quando estes se apresentam em forma de dímeros (D_1/D_2), sua ativação leva a uma ativação de fosfolipase C, através da ativação de uma proteína $G\alpha_q$, levando ao aumento de Ca^{2+} intracelular no corpo estriado de camundongos (HASBI; O'DOWD; GEORGE, 2011; RASHID et al., 2007).

Outro processo bem caracterizado é o de transantagonismo. Este processo ocorre de forma que a ativação de um receptor leva a inativação de outro, como observado no transantagonismo no heterodímero dos receptores A_{2A} para adenosina e dos receptores D_2 para dopamina. A ativação dos receptores A_{2A} leva a uma redução na afinidade dos receptores D_2 pela dopamina na pré-sinapse da via estriadopalidal (FERNÁNDEZ-DUEÑAS et al., 2013; FERRÉ et al., 2008).

O processo de transativação consiste na capacidade do oligômero em iniciar ou inibir uma cascata de sinalização que não era ativada ou inibida pelos receptores em suas formas monoméricas. Resumidamente, na presença de um ligante, o receptor no seu estado monomérico (“1”) não apresenta efeito, no entanto, quando este forma um oligômero, o mesmo ligante é capaz de exercer suas atividades ligando-se em “1” através do receptor acoplado (“2”) (FORRESTER et al., 2016; WANG, 2016).

Nos últimos anos vêm sendo relatadas possíveis aplicações dos processos de oligomerização em doença do SNC (SZAFRAN et al., 2013). Como demonstrado por FUXE e colaboradores que antagonistas dos receptores A_{2A} aumentam a afinidade dos receptores D_2 pela dopamina na DP. Portanto, a heterodimerização (A_{2A}/D_2) tem sido proposta como um alvo promissor para melhorar as dicinesias induzidas por L-Dopa na DP (FUXE et al., 2015). Estudos pré-clínicos demonstram que antagonistas seletivos dos receptores A_{2A} inibem os efeitos motores induzidos por agonistas dos receptores D_2 , revertendo os prejuízos motores observados em modelos animais da DP (CHEN, 2014; PREDIGER, 2010). Contudo, são necessários mais estudos para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de oligomerização e o seu potencial como alvo farmacológico para o tratamento de doenças do SNC.

4.3 O sistema adenosinérgico na DP: foco nos GPCRs A_{2A}

A adenosina é um nucleosídeo endógeno presente em vários tecidos, ligando-se em quatro subtipos de receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , regulando uma grande variedade de processos fisiológicos importantes, tanto em nível central quanto periférico (CHEN; ELTZSCHIG; FREDHOLM, 2013). O sistema adenosinérgico tem atraído a atenção como potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de fármacos para diversas doenças, incluindo a DP (FREDHOLM, 2014).

Os receptores A_1 e A_3 para adenosina são acoplados a proteínas G inibitórias (G_i), promovendo a inibição da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, redução nos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMP_c). Por outro lado, os receptores A_{2A} e A_{2B} para adenosina estão acoplados a proteínas G estimulatórias (G_s), levando a um aumento na atividade da enzima adenilato ciclase e nos níveis de AMP_c (CHEN; ELTZSCHIG; FREDHOLM, 2013; FREDHOLM, 2014).

Os receptores A_{2A} são expressos no estriado, bulbo olfatório e hipocampo de mamíferos, incluindo roedores e humanos (CUNHA et al., 1994; DIXON et al., 1996), e recentemente eles têm atraído a atenção como um potencial alvo terapêutico para diferentes condições patológicas, em especial a DP (para revisão, ver PREDIGER, 2010). Esta maior atenção aos receptores A_{2A} na DP deve-se a sua grande expressão no estriado, onde se encontram localizados quase que exclusivamente em neurônios gabaérgicos na via estriadopalidal (ou via direta) que se projetam para o globo pálido externo (HETTINGER et al., 2001). Nesta via, os receptores A_{2A} modulam diretamente a funcionalidade dos receptores D_2 , como descrito anteriormente, pela formação de

heterômeros. Nesta via os receptores D_2 regulam a execução de movimentos, onde a ativação dos receptores A_{2A} levam a uma redução dos movimentos, enquanto o bloqueio destes receptores estimulam o movimento, justificando assim estudos com antagonistas dos receptores A_{2A} como novos fármacos para o alívio dos sintomas motores da DP (FUXE et al., 2015).

Além disso, a modulação destes receptores pode levar a efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios e, portanto, apresentando efeito benéfico em diversos estudos que utilizam modelos animais de doenças neurodegenerativas, além da DP, como a doença de Alzheimer (CANAS et al., 2009), doença de Huntington (LI et al., 2015) e isquemias cerebrais (MOHAMED et al., 2016). Além disso, o bloqueio dos receptores A_{2A} levaria a um efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas devido a uma redução na excitotoxicidade glutamatérgica (FERREIRA; PAES-DE-CARVALHO, 2001; POPOLI et al., 2003)

Além dos efeitos sobre as funções motoras, os receptores A_{2A} parecem modular funções não motoras. Estudos demonstram que a administração da cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores A_{2A} , é capaz de aumentar o estado de alerta e vigília, além de melhorar a performance de animais e humanos em testes de memória (KADOWAKI HORITA et al., 2013; PREDIGER; FERNANDES; TAKAHASHI, 2005b; SNEL; LORIST, 2011; TAKAHASHI; PAMPLONA; PREDIGER, 2008). Os receptores A_{2A} também parecem estar envolvidos na patofisiologia da depressão, onde o bloqueio dos receptores leva a efeitos antidepressivos (KASTER et al., 2015; YAMADA et al., 2013).

O bloqueio dos receptores A_{2A} também levam a efeitos benéficos no sistema nervoso periférico, principalmente por exercerem efeitos antiinflamatórios em diferentes órgãos como o coração, rins, pulmões e intestino (HEADRICK et al., 2013). Ainda, os receptores A_{2A} apresentam um papel na regulação fisiológica renal, modulando a dilatação de arteríolas, fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular (AL-MASHHADI et al., 2009; CARLSTRÖM; WILCOX; WELCH, 2011; LEVENS; BEIL; JARVIS, 1991).

4.4 Os receptores AT_1 e A_{2A} nos processos de oligomerização

Como citado anteriormente, os receptores A_{2A} apresentam também a característica de formar oligômeros com outros GPCRs. Sendo que o processo que tornou estes receptores um alvo mais proeminente para o desenvolvimento de fármacos para a DP foi a formação do heterômero A_{2A}/D_2 (FUXE et al., 2015).

Os receptores A_{2A} são capazes de interagir com outros GPCRs, além dos receptores D_2 . Por exemplo, estes são capazes de formar heterômeros com receptores metabotrópicos para glutamato do tipo 5 (mGlu5) (FERRÉ et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005). Estes receptores são expressos no corpo estriado em terminações glutamatérgicas e estariam envolvidos em processos de neuroplasticidade, além de modularem a atividade dos neurônios da via estriadopalidal (DE LERA RUIZ; LIM; ZHENG, 2014; GUIDOLIN et al., 2011). Ao contrário dos heterômeros A_{2A} / D_2 , o complexo $A_{2A} / mGlu5$ parece atuar de modo sinérgico, sendo que esta co-ativação, através da administração de agonistas destes receptores, levaria a um aumento da fosforilação da DARP-32 através da formação de AMPc (NISHI et al., 2003).

Previamente foi demonstrado que a formação do complexo $A_{2A} / mGlu5$ nos terminais glutamatérgicos também atua de maneira sinérgica, regulando a liberação de glutamato (RODRIGUES et al., 2005). Também já foi demonstrado que estes receptores são capazes de formarem estruturas ainda mais complexas, como a formação do oligômero $A_{2A} / mGlu5 / D_2$, que também se localizam na via estriadopalidal em terminações nervosas gabaérgicas. Este complexo atua de maneira que os receptores $A_{2A} / mGlu5$ exerçam um efeito inibitório sobre os receptores D_2 , promovendo uma redução expressiva da ligação de agonistas nos receptores D_2 (CABELLO et al., 2009; FERRÉ et al., 2002; MORIN et al., 2015).

Além disso, foi reportada a interação entre os receptores A_{2A} e os receptores canabinoides do tipo CB1, levando uma facilitação da sinalização deste receptor no estriado (FERRÉ et al., 2010; TEBANO; MARTIRE; POPOLI, 2012). Recentemente, observou-se a formação de oligômeros entre os receptores $A_{2A} / CB1 / D_2$, sendo que este teria um papel importante em processos de neurotransmissão e em vias de sinalização (AGNATI et al., 2010). Porém, Pinna e colaboradores mostraram, através de radioensaios, que esta interação é desfeita com a administração aguda ou crônica de L-dopa em ratos hemiparkinsonianos (PINNA et al., 2014).

Assim como observado com os receptores A_{2A} os receptores AT_1 apresentam também a característica de formar oligômeros com outros GPCRs. Como demonstrado recentemente, eles também são capazes de formar heterômeros com os receptores D_2 (MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2015). Apesar de ainda estarem em estágios iniciais, estas evidências indicam que o bloqueio dos receptores AT_1 também induziriam um efeito

transinibitório nos receptores D_2 , reduzindo a formação de AMPc (MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2015).

Li e colaboradores demonstraram que os receptores AT_1 são capazes de formar heterômeros com os receptores D_1 , sendo esta interação importante para a expressão destes receptores na membrana celular na presença de losartana (LI et al., 2012). Ainda, foi demonstrado que a administração de losartana leva a um aumento na formação de AMPc, porém com redução da ligação de agonistas e antagonistas nos receptores D_1 (LI et al., 2012).

Os receptores AT_1 também interagem com os receptores CB_1 , assim como os receptores A_{2A} , porém este heterômero leva a uma facilitação da via de sinalização dos receptores AT_1 , ao contrário do que é observado com os receptores A_{2A} , onde estes levariam a uma facilitação das vias de sinalização dos receptores CB_1 (ROZENFELD et al., 2011). Porém, a utilização de antagonistas CB_1 levariam a uma redução de efeitos deletérios, em particular pró-fibrogênico da angiotensina II, promovidos por esta facilitação (ROZENFELD et al., 2011).

Já foram demonstrados vários outros processos de oligomerização envolvendo os receptores AT_1 . Como demonstrado por Abdalla e colaboradores, onde estes seriam capazes de formar heterômeros com os receptores de bradicinina do tipo 2 (B_2), sendo que este processo leva a uma facilitação da sinalização pelos receptores AT_1 e uma redução da funcionalidade do receptor B_2 , além de alterar as vias pelas quais estes receptores sofrem endocitose (ABDALLA; LOTHER; QUITTERER, 2000). Ainda, também foi demonstrada a interação entre os receptores AT_1 e os receptores adrenérgicos do tipo α_{2c} , levando a uma ativação de uma via de sinalização distinta, promovendo a liberação de noradrenalina dos terminais pré-sinápticos (BELLOT et al., 2015).

Estudos demonstram que existe uma possível interação entre os receptores AT_1 e A_{2A} , principalmente no sistema nervoso periférico. Nestes trabalhos são demonstrados principalmente efeitos sinérgicos destes sistemas de neurotransmissão (ROZENFELD et al., 2011; TCHEKALAROVA; KAMBOUROVA; GEORGIEV, 2000; THAKUR et al., 2010). Estudos envolvendo o sistema nervoso renal, demonstram que existe uma comunicação entre os dois sistemas, onde foi demonstrado que a adenosina é capaz de reverter os efeitos estimulatórios da angiotensina II sobre a atividade da Na^+ ATPase, via receptores A_{2A} (GOMES et al., 2008). Neste caso, a Na^+ ATPase é um dos mecanismos pelos quais o Na^+ é reabsorvido por um transportador ativo na membrana basolateral das células do túbulo proximal (CSAKO, 2006). Ainda, é demonstrado que a adenosina através dos receptores A_{2A} auxiliaria nos

efeitos vasoconstritores induzidos pela angiotensina II ao induzir aumento de cálcio intracelular (LAI et al., 2009).

Infusões de adenosina na artéria braquial deflagram respostas sinaptoexcitatórias através da liberação de noradrenalina, sendo que este reflexo é reduzido pelo tratamento com losartana, embora o mecanismo exato como ocorre esta modulação não seja conhecido (RONGEN et al., 1998). Uma melhor compreensão destes efeitos da adenosina sobre a liberação noradrenérgica, sendo influenciado pelo sistema renina-angiotensina, seria importante para emergências vasculares, onde os níveis de adenosina encontram-se elevados, como na isquemia miocárdica e insuficiência cardíaca congestiva (RONGEN et al., 1998). Além do mais, o bloqueio dos receptores A_{2A} reduz a formação de EROs induzidas pela angiotensina II, via Nox2 (enzima do complexo NADPH) em células endoteliais (THAKUR et al., 2010).

Estas evidências demonstram a importância de uma melhor compreensão de como os sistemas renina-angiotensina e adenosinérgico estariam interagindo para auxiliar no entendimento de processos patológicos e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

4.5 O modelo experimental da reserpina

A reserpina é um alcaloide extraído da raiz da *Rauwolfia serpentina*, um arbusto nativo da Índia. A reserpina foi um dos primeiros fármacos a interferir na ação do sistema nervoso simpático dos seres humanos, sendo utilizado como anti-hipertensivo. Todavia, o uso clínico da reserpina declinou diante da disponibilidade de fármacos mais recentes, eficazes e melhor tolerados, e também em decorrência de seus efeitos adversos relacionados com o SNC: letargia, depressão, discinesias e depressão (CSAKO, 2006; FREIS, 1954).

A administração de reserpina leva a uma inibição do transportador vesicular de monoaminas no SNC (VMAT₂), levando a uma depleção dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina. Portanto, as vesículas tornam-se disfuncionais, perdendo a capacidade de armazenar os neurotransmissores, com pouca ou nenhuma liberação destes neurotransmissores pelas terminações nervosas após sofrerem despolarização (CSAKO, 2006; PETER et al., 1994).

Baseados no desenvolvimento destes efeitos adversos, a reserpina vem sendo utilizada como uma ferramenta farmacológica importante para mimetizar uma variedade de respostas comportamentais relacionados a doenças e transtornos do SNC que levam ao desbalanço destes sistemas de neurotransmissores em modelos animais (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957; SKALISZ et al.,

2002). Embora considerada ultrapassada em comparação a outros modelos experimentais, o modelo da reserpina continua sendo um modelo útil para a pesquisa de fármacos capazes de modular estes sistemas de neurotransmissão (ROJAS-CORRALES, 2004; SALAMONE; BASKIN, 1996).

A relação da reserpina com a DP teve início com os estudos pioneiros de Carlsson e colaboradores, onde foi mostrada a capacidade da L-dopa em reverter estados de acinesia induzidos pela reserpina em coelhos (CARLSSON, 1975; LEES; TOLOSA; OLANOW, 2015). Além disso, dependendo da dose utilizada, a reserpina é capaz de induzir sintomas motores e não motores em animais de laboratório. Neste sentido, a reserpina vem sendo utilizada para induzir comportamentos do tipo ansiedade (KUMAR et al., 2012), depressivos (BISONG; BROWN; OSIM, 2010), anedônicos (SKALISZ et al., 2002), sensibilização nociceptiva (ARORA et al., 2011) e prejuízos de aprendizado e memória (AGUIAR et al., 2009; PREDIGER; DA CUNHA; TAKAHASHI, 2005; PREDIGER et al., 2008b; TSENG et al., 2015).

A reserpina é também utilizada para a indução de movimentos involuntários, como os movimentos mandibulares involuntários, sendo que estes sintomas são correlacionados ao efeito colaterais de antipsicóticos, portanto um modelo de discinesia tardia (WANG et al., 2015) ou correlacionados ao efeito colateral da L-dopa, discinesias orais (AIA et al., 2011). Porém nestes modelos, o tratamento com a reserpina promove a autooxidação da dopamina e catabolismo oxidativo pela monoamina oxidase (MAO), estando estes eventos relacionados com o processo de estresse oxidativo, sendo estes eventos atenuados por diversas substâncias antioxidantes (TREVIZOL et al., 2011; WANG et al., 2015).

4.5 Justificativa e hipótese do trabalho

Uma vez que existem evidências na literatura indicando uma forte relação entre os sistemas renina-angiotensina e adenosinérgico, principalmente através dos receptores AT_1 e A_{2A} , hipotetizamos que estes receptores estariam atuando de forma sinérgica, sendo capazes de atenuar as alterações comportamentais induzidas pela reserpina. E ainda, hipotetizamos que o mecanismo pelo qual estes receptores para angiotensina II e adenosina estariam exercendo seus efeitos seria através da formação de um heterômero (AT_1/A_{2A}).

4.6 Objetivo geral

O objetivo geral do presente capítulo é investigar o processo de oligomerização entre os receptores AT₁ e A_{2A}, e se estes receptores atuam de forma sinérgica no SNC.

4.6.1 Objetivos específicos

- Caracterizar a co-distribuição dos receptores AT₁/A_{2A}, através de um modelo *in vitro* de culturas de células da linhagem HEK-293 transfectadas com os cDNA dos respectivos receptores através da técnica de imunocitoquímica;

- Caracterizar a interação entre os receptores AT₁/A_{2A}, através de um modelo *in vitro* de culturas de células da linhagem HEK-293 transfectadas com os cDNA dos respectivos receptores através da técnica de transferência de energia por ressonância bioluminescente (BRET);

- Caracterizar a influência do processo de heterodimerização dos receptores AT₁/A_{2A} sobre a liberação de cálcio através de um modelo *in vitro* de culturas de células da linhagem HEK-293 transfectadas com os cDNA dos respectivos receptores pela técnica de medição do cálcio fluorescente (Fluo-4);

- Caracterizar a co-localização dos receptores AT₁ e A_{2A} no estriado de camundongos através da técnica de imunohistoquímica;

- Investigar o processo de heterodimerização dos receptores AT₁/A_{2A} no estriado de camundongos através do ensaio de ligação por proximidade (PLA);

- Avaliar os níveis dos receptores AT₁ e A_{2A} nos sinaptosomas estriatais de camundongos selvagens e knockouts para o receptor A_{2A};

- Avaliar o possível efeito sinérgico dos receptores AT₁/A_{2A} através da coadministração de doses sub-efetivas de um antagonista dos receptores AT₁ e de um antagonista dos receptores A_{2A} no modelo dos movimentos mandibulares involuntários induzidos pela reserpina em camundongos selvagens.

- Avaliar o efeito da losartana no modelo dos movimentos involuntários da mandíbula induzidos pela reserpina em camundongos knockouts para o receptor A_{2A}.

4.7 Material e Métodos

4.7.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss de 3 meses de idade (selvagens) e camundongos Swiss de 3 meses de idade knockout para o receptor A_{2A} para adenosina, provenientes do biotério

do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e do Departamento de Farmacologia da Universidade de Barcelona. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas retangulares (49 x 34 x 16 cm), em número máximo de 15 animais por gaiola. Os animais foram mantidos em gabinetes a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos desta tese estão de acordo com os padrões éticos legais e foram aprovados pela Comissão de Ética para o uso de animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo número PP0830/2013.

4.7.2 Drogas

Para os testes comportamentais utilizou-se a losartana nas doses de 0,05; 0,5; 5 e 50 mg/kg e de KW-6002 nas doses de 0,03; 0,06; 0,3 e 0,6 mg/kg, sendo usado o PBS como solução veículo. Estas drogas foram administradas pela via i.p. 30 minutos antes dos testes comportamentais. A reserpina foi utilizada na dose de 1 mg/kg e foi administrada duas vezes pela via subcutânea (s.c.) com um intervalo de 48 h para a indução dos movimentos mandibulares involuntários (avaliados 24 h após a última administração da reserpina). No ensaio de mobilização de cálcio utilizou-se a angiotensina II na dose de 50 nM, sendo esta dose selecionada em ensaios de dose-resposta não mostrados.

4.7.3 Ensaios in vitro

4.7.3.1 Clonagem Molecular

4.7.3.1.1 Amplificação por Reação de Cadeia Polimerase (PCR)

Na amplificação dos fragmentos de DNA por PCR para a síntese dos plasmídeos empregados nesta tese, foi utilizada uma pré-mescla pronta para o uso de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, EEUU), que contém o DNA polimerase, dNTPs, MgCl_2 e os tampões necessários para a correta união dos primers e a amplificação dos fragmentos de DNA. Para isso, a mescla de GoTaq® Green Master Mix foi descongelada a temperatura ambiente e em seguida homogeneizada em vortex. Adicionou-se 25 μl desta mescla, 0,5 μl do primer forward, 0,5 μl de primer reverso, 1 μl de DNA para reconhecimento e 25 μl de H_2O . Os eppendorfs contendo esta mescla foram colocados num termociclador Thermal Cycler (Bio-Rad®) e a reação de PCR deu-se seguindo as recomendações do fabricante.

4.7.3.1.2 Digestão com enzimas de restrição

Enzimas de restrição são proteínas que reconhecem uma curta sequência de DNA específica e clivam a dupla fita em um ponto específico. Esta sequência específica denomina-se “sítio de restrição”. Uma vez reconhecido este sítio pela enzima, ela se posiciona sobre a molécula de DNA e corta dentro e ao entorno da sequência. As extremidades de cadeia simples formadas podem se unir a outras extremidades de cadeia simples com a sequência complementar por enzimas chamadas ligases. Estas enzimas podem ser classificadas em: i) enzimas geradores de extremidades; foram utilizadas: $ECO\ R\ 5' \text{---} GAT/ATC \text{---} 3'$ e $3' \text{---} CTA/TAG \text{---} 5'$ e ii) enzimas geradoras de extremidades coesivas, foram utilizadas $ECO\ R\ 5' \text{---} G/AATTC \text{---} 3'$ e $3' \text{---} \text{---}CTTAA/G \text{---} 5'$; $Kpn\ 5' \text{---} GTCA/C \text{---} 3'$ e $3' \text{---} C/CATGG \text{---} 5'$. Todas as enzimas de restrição empregadas foram obtidas de Promega®. O corte enzimático se realizou seguindo as recomendações do fabricante.

4.7.3.1.3 Ligação do DNA com a enzima T4 DNA ligase

Enzimas DNA ligase catalisam a síntese de ligações fosfodiéster de uma extremidade 5' e uma extremidade hidroxila 3' que estão próximas e que fazem parte de um DNA de cadeia dupla. A enzima utilizada na presente tese foi T4 DNA ligase (enzima codificada pelo gene 30 do bacteriófago T4), que utiliza ATP como fonte de energia para a reação. Assim, uma unidade de enzima é a quantidade necessária para hidrolisar ATP produzindo 1 mmol pirofosfato (PPi) durante 20 minutos a 37 °C. Ao contrário de outras ligases, pode-se juntar ambas extremidades sem corte e coesa. Os reagentes necessários para a ligação foram: T4 DNA ligase 1 U /uL (Promega); Tampão T4 DNA ligase 10X 300 mM de Tris-HCl pH 7,8, 100 mM de MgCl₂, 10 mM de ATP, 100 mM de DTT. Os cálculos para determinar a concentração de vetor e inserto deu-se através da seguinte fórmula: $(ng\ do\ vetor \times kb\ do\ inserto / kb\ do\ vetor) \times razão\ molar\ 1:3\ do\ inserto / vetor = ng\ de\ inserto$. As reações de ligações seguiram as recomendações do fabricante. A reação foi incubada em um gradiente de temperatura de 4°C a 20°C durante 16 horas.

4.7.3.1.4 Transformação de bactérias competentes

A transformação de bactérias competentes é um processo pelo qual se altera geneticamente uma bactéria por incorporação e a expressão de DNA exógeno. Durante a transformação, o DNA exógeno é inserido através da membrana da célula bacteriana, por absorção direta. Este fenômeno ocorre naturalmente em algumas espécies de bactérias, mas a transformação também pode ser efetuada por meios artificiais. Para

ocorrer a transformação das bactérias, estas devem estar num estado de competição, o que pode ocorrer como uma resposta de tempo limitado a condições ambientais, tais como a falta de nutrientes e densidade celular elevada. As bactérias utilizadas nesta tese foram bactérias competentes *Escherichia coli* (*E. coli*) HB101 (Promega). Para a transformação foi realizado o seguinte protocolo: as bactérias foram descongeladas em gelo durante 30 min. Em seguida, 50 µl de bactérias foram adicionados a cada um dos produtos resultantes da ligação de DNA, e mantidos em gelo durante 30 min. As bactérias foram então submetidas a um choque térmico de 45 segundos a 42 °C e imediatamente incubadas em gelo durante 3 min.

Em seguida, 1 ml de meio de cultura LB estéril foi adicionado e incubado durante 1 hora a 37 °C sob agitação constante. As bactérias foram centrifugadas por 5 minutos a 7000 rpm e o sedimento ressuspenso em 100 µl de LB estéril. As bactérias foram plaqueadas em LB-agar suplementadas com antibióticos específicos para a resistência do plasmídeo inserido nas bactérias. A placa foi incubada durante a noite a 37 °C. Dez colônias foram suspensas em 3 ml de meio de cultura e incubou-se sob agitação constante durante 16 horas a 37 °C. O DNA foi extraído a partir de colunas de extração de bactérias por JETquick kit de plasmídeo maxiprep (Genomed, Löhne, Alemanha) e analisados pelo método de sequenciação pelo kit Sanger BigDye® V (Applied Biosystems Hispania SA, Alcobendas, Espanha).

4.7.3.2 Cultivo celular

Neste estudo foi utilizada a linhagem de células HEK-293T (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA). Esta linhagem celular deriva de células de rim humano embrionário imortalizadas que expressam o antígeno T longo do vírus SV40, o qual permite a replicação episomal de plasmídeos que contém uma origem e a região do promotor precoce do SV40. As células HEK-293T foram cultivadas a uma temperatura constante de 37 °C, umidade relativa de 90% e uma atmosfera controlada 5% de CO₂ em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Todas as manipulações das células foram realizadas em exaustores de fluxo laminar, com material estéril e sob condições que permitiram assegurar a esterilidade da cultura.

4.7.3.3 Transfecção de células por PEI

A transfecção deu-se por meio químico pelo agente polietilenimina (PEI) (Polysciences, Inc. Warrington, PA EUA). O PEI é

um polímero catiônico sintético que gera complexos para proteger o DNA. Estes complexos interagem com proteoglicanos aniônicos da membrana e penetram na célula por endocitose.

Uma vez que as células atingiram 75-80% de confluência na placa, foram preparadas duas misturas. A primeira com o DNA e 150 mM de NaCl, e a segunda mistura com PEI 1 mg/mL e 150 mM de NaCl. As proporções de DNA: PEI utilizados neste tipo de transfecção foram de 1: 4. Uma vez que as duas misturas foram preparadas em separado, adicionou-se a mistura de PEI / NaCl à mistura de DNA / NaCl e foram agitadas de modo a obter uma mistura homogênea de PEI / DNA. Em seguida, a mistura (PEI / DNA) foi deixada em repouso durante 20 min à temperatura ambiente. Após este tempo, a mistura contendo o complexo foi cuidadosamente colocada sobre a superfície da placa para a qual tinha sido previamente renovado o meio DMEM completo (½ do volume total da placa). As células foram incubadas durante 4-5 horas a 37 °C e o meio foi renovado após este período com meio DMEM completo.

4.7.3.4 Imunocitoquímica das células HEK-293T

Para os estudos de imunocitoquímica, as células HEK-293T transitoriamente transfectadas com AT₁R-YFP e A_{2A}R-CFP foram fixadas em paraformaldeído (PFA) a 4% durante 15 min e lavou-se em um recipiente de solução salina tamponada com fosfato contendo 20 mM de glicina para extinguir os grupos aldeído e as lâminas foram montadas para posterior análise (NAVARRO et al., 2012). As proteínas YFP e CFP foram detectadas por fluorescência em microscópio co-focal Leica SP2 (Leica Microsystems®).

4.7.3.5 Transferência de energia por ressonância bioluminescente (BRET)

No ensaio de BRET, a energia transferida para o acceptor é a bioluminescência gerada por uma luciferase, uma enzima catalizadora da oxidação da colenterazina. Normalmente a enzima utilizada é uma luciferase de *Rennila reniformis* (*Rluc*). O substrato utilizado em nosso caso foi a Coelenterazina-h. Além disso, a molécula acceptora em nossos experimentos foi a proteína YFP (Proteína de Fluorescência Amarela, ver os resultados). Assim, a emissão gerada pelo substrato (480 nm) excitou a YFP, que por sua vez, emitiu luz a um comprimento de onda de 520 nm.

Para gerar curvas de BRET, várias transfecções em que uma quantidade constante de GPCR dador e quantidades crescentes de GPCR acceptor (ex.: fundido com *Rluc* e YFP, respectivamente) foram realizadas, 36 horas após a transfecção, as células foram lavadas com PBS,

ressuspensas neste mesmo tampão e plaqueadas em placas de 96 poços brancas. Em seguida, as células foram incubadas com coelenterazina-H 5 μ M de substrato durante 1 minuto e foi medida por um leitor de placas Polarstar, emissão a 520 e 480 nm. A relação entre os dois é representado como sinal BRET. Para compensar a sobreposição entre a emissão da referida coelenterazina-H e YFP, um dos pontos nestes ensaios levaram apenas a construção com *Rluc*, de modo que a proporção BRET obtido nestas condições foi subtraída das amostras restantes. Em seguida, as razões de BRET representados graficamente como uma função da fluorescência total, obtidos por excitação direta do acceptor e normalizada a luminescência do doador. O ajuste dos dados a uma curva hiperbólica saturável denota que a interação era específica.

4.7.3.6 Medição de fluorescência da concentração de Ca^{2+} intracelular

Para a mensuração da mobilização de cálcio de células HEK293T transitoriamente transfectadas, utilizou-se o cálcio fluorescente Fluo-4 Non- Wash kit de ensaio da Molecular Probes (Invitrogen®). As células HEK293T foram semeadas durante a noite a uma densidade de 1×10^5 células / poço, em uma placa de 96 poços com fundo claro. Após remoção do meio, foi adicionado Fluo-4 durante 60 min a 37 °C. Em seguida, o Fluo-4 foi removido e as células foram incubadas com 80 μ L de HBSS. As respostas foram medidas à temperatura ambiente num leitor de placas Polarstar Optima (BMG Lab Technologies). Foram medidos sinais de fluorescência a 530 nm. Para cada experimento, a fluorescência basal foi medida por 10 s e em seguida foi adicionada a angiotensina II e a fluorescência foi continuamente monitorada em intervalos de 1 segundo por 1 min. Aos 40s, adicionou-se a ionomicina e as curvas foram expressas como percentagem do sinal provocado por ionomicina (U.F.) para cada condição experimental.

4.7.4 Ensaios ex vivo

4.7.4.1 Imunofluorescência

Os camundongos foram anestesiados e perfundidos com 200 ml de PFA a 4% em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Os cérebros foram pós-fixados durante a noite na mesma solução de PFA a 4 °C. Cortes coronais (25 μ m) usando um vibrátomo foram processados (Leica Lasertechnik). Fatias foram coletadas em solução anti-congelante de Walter (30% de glicerol, 30% de etileno glicol em PBS, pH 7,2) e mantidas a -20 °C até o seu processamento.

As fatias previamente coletadas foram lavadas três vezes em PBS, permeabilizadas com 0,3% de Triton X-100 em PBS durante 2 horas e lavou-se três vezes com solução de lavagem (0,05% de Triton X-100 em PBS). As fatias foram então incubadas com solução de bloqueio durante 2 horas à temperatura ambiente e subsequentemente incubadas com os anticorpos primários durante a noite a 4 °C. Depois de duas lavagens (10 minutos cada) com 1% de NDS na solução de lavagem, incubaram-se durante 2 horas a secções com os anticorpos secundários apropriados conjugados com corantes Alexa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida, lavou-se duas vezes durante 10 minutos cada com 1% de NDS na solução de lavagem e mais duas vezes com PBS, então as lâminas foram montadas. As imagens de fluorescência do estriado foram captadas com um microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik GmbH).

4.7.4.2 Ensaio de ligação por proximidade (PLA)

Para o ensaio de PLA, usou-se o kit para detecção *in situ* de PLA Duolink (Olink Bioscience, Uppsala, Suécia). Procedeu-se de modo semelhante ao protocolo de imunohistoquímica descrito acima, até o passo da incubação do anticorpo secundário. Em sequência foram realizados passos seguindo o protocolo do fabricante. As imagens de fluorescência foram obtidas em um microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik GmbH). Imagens de alta resolução foram adquiridos como um Z-stack (sobreposição de imagens) de 0,2 µm de intervalo com um total de 5 µm de espessura. O sinal não específico nuclear foi eliminado a partir de imagens PLA subtraindo a marcação nuclear de DAPI. As partículas foram contadas utilizando ImageJ (NIH). Para cada imagem o número de partículas oligoméricas e núcleos dos neurônios foram obtidas e a relação entre elas era calculado. Para todos os experimentos de qualificação foram realizadas pelo menos seis imagens.

4.7.4.3 Obtenção sinaptossomas totais

Os animais (camundongos selvagens e knockout para o receptor A2A) foram eutanasiados por deslocamento cervical e os estriados de seis animais foram retirados e homogeneizados em potter com 2 mL de tampão para isolamento (Sacarose/CaCl₂/MgCl₂/ inibidor de protease). Este produto foi posto em um tubo para centrifugação e adicionou-se sacarose CaCl₂ 2M e CaCl₂ 1M, afim de formar um gradiente e o restante do volume foi completado com tampão de isolamento. Centrifugou-se por 3 horas à 100.000 g à 4°C. O halo leitoso formado que continha os

sinaptossomas foi retirado e diluiu-se em tampão de isolamento. Centrifugou-se por 30 min à 15.000 g sob temperatura de 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet continha os sinaptossomas totais, que foram armazenados à -20°C para posterior utilização.

4.7.5 Teste bioquímico

4.7.5.1 Imunodeteção de proteínas: Western blotting

Realizou-se a imunodeteção de proteínas conforme descrito anteriormente no item 2.5.5.1 na página 23, utilizando os anticorpos primários anti-A_{2A}, anti-AT₁ e anti-actinina dos sinaptossomas dos animais selvagem e KO-A_{2A};

4.7.6 Teste comportamental

4.7.6.1 Movimentos mandibulares involuntários induzidos pela reserpina

Para quantificação dos movimentos mandibulares involuntários induzidos pela reserpina, os camundongos foram colocados individualmente em um cilindro de vidro (16 cm x 30 cm x 19 cm) e a frequência dos movimentos involuntários da mandíbula (VCM) (da abreviação em inglês *vacuous chewing movements*) eram contados manualmente por 10 minutos. Os VCMs foram definidos como aberturas de boca, não relacionadas a *grooming* ou direcionados às paredes do cilindro, como descrito por Carvalhos e colaboradores (CARVALHO et al., 2003).

4.8 Resultados

4.8.1 Receptores AT₁ formam heterômeros com receptores A_{2A} em ensaios in vitro

Como observado na Figura 39A, os receptores AT₁ e A_{2A} se co-distribuem em células HEK293-T, revelando que os receptores podem formar heterômeros. Nos últimos 15 anos, vários estudos têm demonstrado os GPCRs podem interagir e dar origem a homo e heterodímeros. Enquanto homômeros levariam a uma função fisiológica semelhante a dos receptores em sua forma monomérica, a formação de heterodímeros fornece uma função fisiológica distinta daquela observada pelas unidades constituintes. Neste sentido, primeiro analisamos se os receptores AT₁ interagem fisicamente com os receptores A_{2A}, para posteriormente estudarmos as possíveis vias de sinalização envolvidas.

Para isso, realizamos o ensaio de BRET. Como representado na Figura 39B, podemos observar que nas células co-transfectadas com A_{2A}

Rluc/AT₁YFP ocorre claramente uma curva de saturação quando quantidades do acceptor (AT₁YFP) foram aumentadas. Como demonstrado na Figura 39C, onde o teste “t” de *student* revela que o BRET máximo obtido é significativamente maior quando comparado com a preparação co-transfectada com GABAB2Rluc/AT₁YFP, o controle negativo. Esta interação específica demonstrada pela comparação das curvas de saturação de BRET, indicam pela primeira vez a ocorrência da interação entre A_{2A} e AT₁, para formar o heterômero A_{2A}/AT₁.

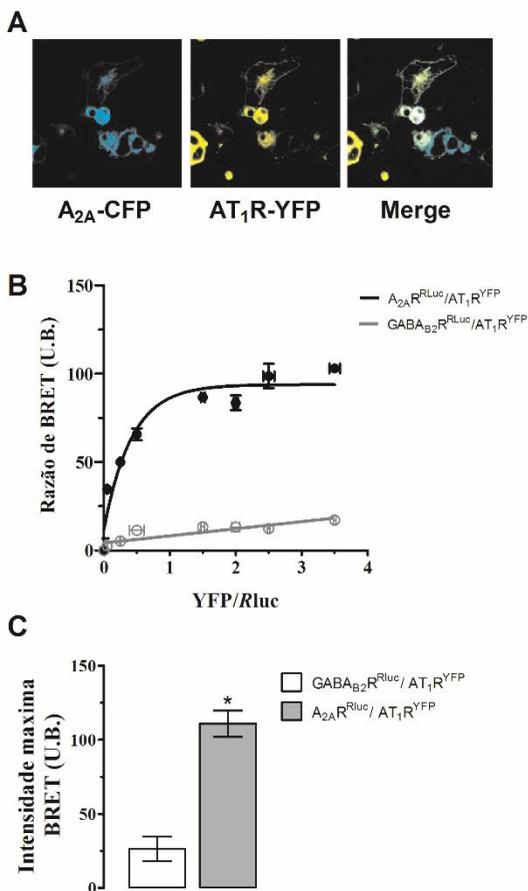


Figura 39. (A) O ensaio de imunocitoquímica foi realizado em células HEK-293-T que co-expressam $A_{2A}R^{CFP}$ (esquerda/ciano) e AT_1R^{YFP} (centro/amarelo) e a figura Merge (direita) representa a sobreposição das imagens obtidas por microscopia co-focal ($10\mu m$). (B) Análise representativa da curva de saturação de BRET em células HEK-293-T que co-expressam $GABA_{B2}R^{Rluc}/AT_1R^{YFP}$ e $A_{2A}R^{Rluc}/AT_1R^{YFP}$. As co-transfecções foram realizadas com quantidade fixa de *Rluc* e em quantidades crescentes de *YFP* (eixo x). Os pontos que interconectam as linhas são expressos em média \pm E.P.M e representam experimentos realizados em triplicata, o eixo y expressa a razão de unidades de BRET (U.B.). (C) As barras representam o valor máximo obtido na curva de saturação, B e são expressas em média \pm E.P.M, de experimentos realizados em triplicata. $*P < 0,05$ comparado as unidades de BRET máximo do grupo $GABA_{B2}R^{Rluc}/AT_1R^{YFP}$ (controle negativo) (Teste “t” de student).

4.8.2 Células co-transfectadas aumentam a mobilização de cálcio

Na tentativa de explorar as implicações da formação do heterômero AT₁R/A_{2A}R, realizamos o ensaio de liberação de cálcio em resposta ao agonista endógeno dos receptores AT₁R, a angiotensina II. Como ilustrado na Figura 40A, as células que co-expressam os receptores A_{2A}R/ AT₁R apresentam uma maior quantidade de cálcio liberada em resposta a angiotensina II. Na Figura 40B, são apresentados os mesmos resultados, porém o Δ representa os resultados subtraídos dos resultados obtidos pelo grupo controle, pois esta linhagem celular é proveniente de rim humano e naturalmente apresenta receptores AT₁R, ocorrendo então a liberação de cálcio frente ao estímulo do agonista. A ANOVA de uma via demonstra uma diferença significativa entre os grupos experimentais [$F_{(2,6)}=8,40$ ($P\leq 0,05$)]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls indica que ocorre um aumento da liberação de cálcio no grupo A_{2A}R/AT₁R comparado com o grupo A_{2A}R ($P\leq 0,05$), figura 40C.

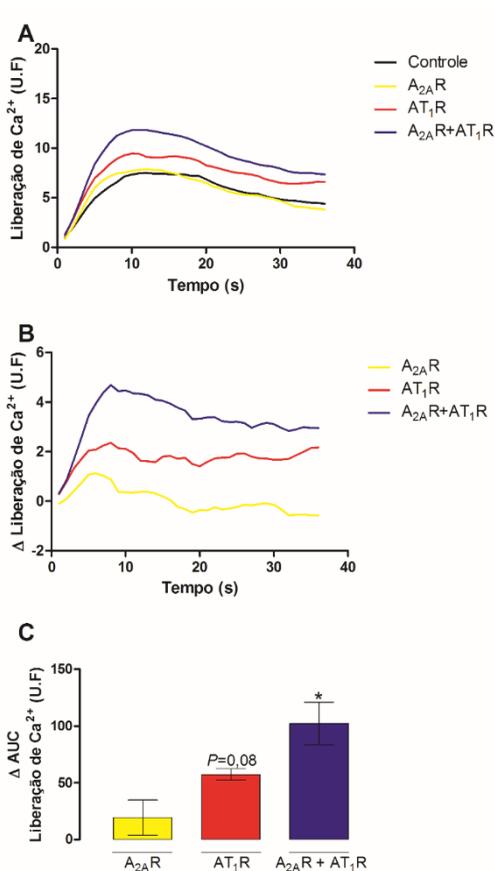


Figura 40. O ensaio de liberação de cálcio foi realizado em células HEK-293-T transfetadas com PcDNA3 (controle), $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}/\text{AT}_1\text{R}$, AT_1R ou $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$. Os estoques de cálcio foram mobilizados com a adição de angiotensina II 50 nM, e o sinal de fluorescência foi mensurado (U.F.). **(A)** O gráfico expressa a quantidade de cálcio mobilizado na presença de angiotensina II nos quatro grupos experimentais. **(B)** O gráfico expressa a quantidade de cálcio mobilizado na presença de angiotensina II, o Δ representa os grupos experimentais quanto subtraídos os valores de U.F. obtidas no grupo controle. **(C)** O gráfico expressa a área sob a curva dos valores obtidos em B. Os experimentos foram realizados em triplicata. $*P < 0,05$ comparado as U.F do grupo $\text{A}_{2\text{A}}\text{R}$ (ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls).

4.8.3 Receptores AT₁ formam heterômeros com receptores A_{2A} em ensaios ex vivo

Para analisarmos se também existiria a formação destes heterômeros no SNC, realizamos a técnica de imunofluorescência no estriado de camundongos Swiss. Como ilustrado na Figura 41A, os receptores AT₁ e A_{2A} se co-localizam no estriado dos animais, revelando que pode existir a formação destes heterômeros no SNC de mamíferos. Para confirmarmos se realmente a sobreposição das marcações para os receptores (A_{2A}R/AT₁R) observada era um indicativo da presença de heterômeros, realizamos o ensaio de PLA. Como observado na Figura 41B, ocorre a formação de pontos positivos (vermelhos), indicando a presença dos heterômeros. O teste “t” de student revelou uma diferença significativa na formação de complexos quando comparados os pontos positivos formados no estriado de camundongos selvagens (WT) e camundongos knockout para o receptor A_{2A}R (KO) [t= 15,09 P≤0,05],

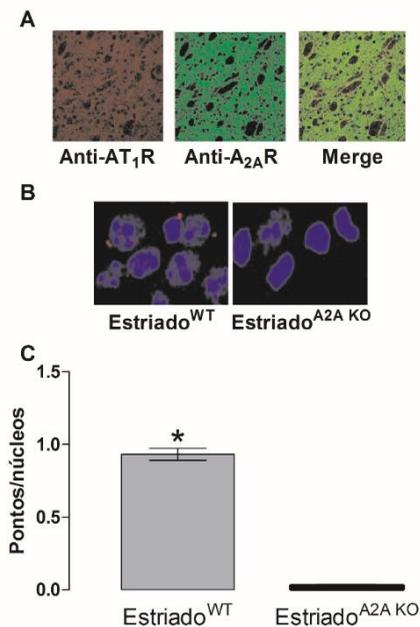


Figura 41. (A) Imagens representativas da co-localização dos receptores AT₁R (esquerda/vermelho), A_{2A}R (centro/verde) e a merge (direita) no estriado de camundongos swiss. (B) Imagens representativas do ensaio de PLA no estriado de camundongos swiss selvagens (WT) e knockout para o receptor A_{2A}R (KO), os pontos vermelhos representam a reação positiva de PLA, em azul a marcação dos núcleos celulares. (C) As barras representam o número total de pontos / pelo número total de núcleos. Os dados são expressos em média ± E.P.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo A_{2A}R (KO) (teste “t” de student).

4.8.4 Os receptores AT₁ e A_{2A} apresentam efeito sinérgico no SNC de camundongos

Para tentarmos compreender o papel da interação destes receptores no SNC, realizamos o teste comportamental dos movimentos mandibulares involuntários (VCM) induzidos pela reserpina. Como ilustrado na Figura 42A, podemos observar que as doses de losartana de 0,5, 5 e 50 mg/kg foram capazes de reduzir o número de VCM [*post-hoc* Newman-Keuls ($P \leq 0,05$)], enquanto que a dose de 0,05 mg/kg não foi

efetiva em reduzir o número VCM [*post-hoc* Newman-Keuls ($P \geq 0,05$)]. Na Figura 42B são ilustrados os efeitos da curva dose resposta do KW-6002 (antagonista A_{2A}). O teste *post-hoc* Newman-Keuls indicou que ocorreu uma redução dos VCM nas doses de 0,06, 0,3 e 0,6 mg/kg ($P \leq 0,05$) e a dose de 0,03 mg/kg ($P \geq 0,05$) não foi capaz de reduzir os VCM. Na Figura 42C, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que a coadministração das doses sub-efetivas de losartana e KW-6002 foi capaz de reduzir o número de VCM ($P \leq 0,05$). Na Figura 42D, utilizou-se animais knockout para o receptor A_{2A} , onde o teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que a administração de uma dose efetiva (50 mg/kg) ou sub-efetiva (0,05 mg/kg) de losartana (quando testadas nos animais selvagens) foram capazes de reduzir o número de VCM nos animais knockout para o receptor A_{2A} ($P \leq 0,05$).

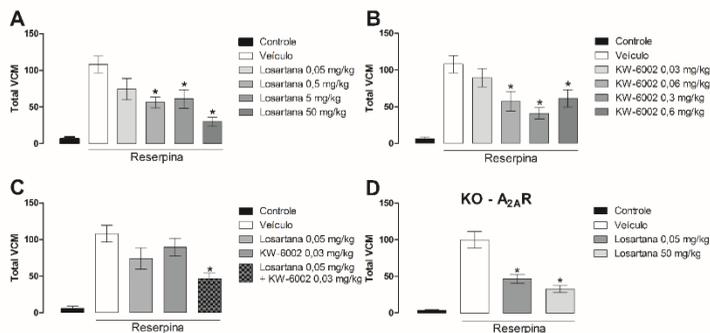


Figura 42. Avaliação dos movimentos mandibulares involuntários induzidos por reserpina (1 mg/kg, s.c.) os efeitos dos tratamentos com losartana e KW-6002 em camundongos. As barras verticais representam o número total de VCM em 10 min (média \pm E.P.M.). (A) curva dose-resposta da losartana. (B) curva dose resposta do KW-6002. (C) Efeito sinérgico das doses sub-efetivas de losartana e KW-6002. (D) Efeito do tratamento com losartana em animais knockout para o receptor A_{2A} . * $P \leq 0,05$ comparado com o grupo veículo/reserpina (ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls) ($n=7-10$ /grupo).

4.8.5 Animais knockout para o receptor A_{2A} apresentam níveis elevados do receptor AT_1

Como representado na Figura 43, os níveis dos receptores AT_1 em preparações de sinaptosomas totais do estriado de camundongos knockout para o receptor A_{2A} (KO) estão elevados em relação aos níveis estriatais dos camundongos selvagens (WT).

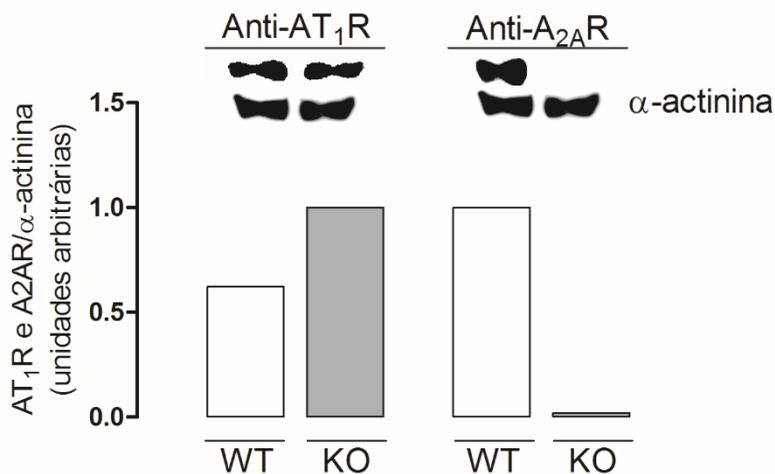


Figura 43. Gráfico representativo dos níveis dos receptores AT₁ e A_{2A} em sinaptossomas totais. As barras verticais representam os níveis das proteínas em unidades arbitrarias. (Esquerda) Níveis dos receptores AT₁ e (Direita) níveis dos receptores A_{2A} em sinaptossomas totais de camundongos selvagens (WT) e knockout para os receptores A_{2A} (KO) (pool de seis estriados).

4.9 Discussão

A principal hipótese deste capítulo foi baseada em evidências que indicam um efeito sinérgico dos receptores AT₁ e A_{2A}, principalmente no sistema renal. Nossos resultados demonstram de maneira inédita a formação do heterodímero AT₁/A_{2A} no estriado de camundongos. Além disso, demonstramos que estes receptores atuam de modo sinérgico no SNC, reduzindo os movimentos mandibulares involuntários induzidos pela reserpina em camundongos.

Os GPCRs representam uma super-família de proteínas de membrana que incluem aproximadamente 4% dos genes codificados pelo genoma humano. Estes receptores estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, sendo que aproximadamente 50% dos medicamentos utilizados atualmente têm como alvo os GPCRs (LAGERSTRÖM; SCHIÖTH, 2008). Nos últimos anos, tem sido demonstrado que os GPCRs não são apenas proteínas de membrana isoladas, mas são receptores que apresentam a capacidade de formar complexos multi-proteicos (oligômeros) (GEORGE; O'DOWD; LEE, 2002).

As evidências que nos levaram a supor que os receptores AT₁ e A_{2A} estariam formando heterômeros no SNC, baseou-se em uma série de estudos que demonstravam que estes receptores apresentam peculiaridades muito semelhantes. É demonstrado que estes receptores são amplamente expressos no SNC, principalmente no estriado e substância negra, também estando expressos em células da glia, tanto em roedores quanto em humanos (GARRIDO-GIL et al., 2013; HETTINGER et al., 2001; SAAVEDRA, 1999). Além disso, como já citado anteriormente, estes receptores são capazes de formar dímeros com os receptores de dopamina do tipo D₂, modulando a liberação de dopamina (FERNÁNDEZ-DUEÑAS et al., 2013; MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2015)

Inicialmente, avaliamos se os receptores se co-distribuíam em células HEK-293T, sendo que observamos que ocorre a co-distribuição destes receptores nestas células. Em seguida, utilizando a técnica de BRET, caracterizamos que além deles estarem co-distribuídos nestas células, eles também são capazes de formar dímeros, uma vez que a curva de saturação foi positiva. O BRET é uma técnica muito utilizada para o estudo da interação receptor-receptor em células, tendo como principal ponto positivo o controle sobre o sinal de fundo (background) nos experimentos. Por outro lado, ela não é uma técnica muito sensível para detectar interações receptor-receptor em determinado local celular, como

por exemplo, se existe uma interação especificamente na membrana ou no citosol da célula (MILLIGAN, 2004).

Após observarmos este fenômeno, tentamos compreender de que forma este complexo estaria modulando as vias de sinalização dos receptores AT_1 , através da medida do cálcio liberado após a administração da angiotensina II na preparação. Observamos que ocorre um incremento na quantidade de cálcio liberada nas células que apresentavam os dois receptores, indicando que os receptores A_{2A} facilitariam a sinalização mediada pelos receptores AT_1 .

Na maioria dos casos, a modulação de sinalização do dímero refere-se ao aumento ou diminuição da ativação da proteína G acoplada a cada receptor, embora em vários estudos têm sido demonstrado que podem ocorrer diferentes efeitos sobre as vias de sinalização, como efeitos trans-inibitórios e trans-estimulatórios (ROZENFELD; DEVI, 2011). Alguns estudos observaram uma nova forma de acoplamento da proteína G, como por exemplo no heterodímero dos receptores D_1/D_2 para dopamina, que são classicamente acoplados a uma proteína G_s e G_i , respectivamente, e ao formarem o oligômero, são capazes de ativar uma proteína G_q , modulando a sinalização intracelular do cálcio (RASHID et al., 2007). Neste mesmo estudo, os autores demonstram que este complexo é mais funcional (capaz de ativar a proteína G_q) em animais de 8 meses de idade comparados com animais de 3 meses de idade, sendo que este processo pode ser relevante no processo de envelhecimento (RASHID et al., 2007).

Neste mesmo sentido, Bellot e colaboradores (2015) demonstraram recentemente que após a formação do heterodímero (AT_1/α_2c) ocorre a ativação de uma via de sinalização distinta das vias clássicas ativadas por estes receptores, através de uma proteína G_s -AMPc-PKA, levando a uma modulação na liberação de noradrenalina. A formação deste complexo ocorreria em casos de hipertensão e falência cardíaca, ou seja, poderia ocorrer a formação de dímeros em casos patológicos, com o recrutamento de vias de sinalização completamente distintas das vias já descritas para os receptores que compõem o dímero (BELLOT et al., 2015).

Por outro lado, poderíamos supor que esta facilitação da neurotransmissão ocorreria através da ativação do complexo cálcio-calmodulina (CaM). A CaM é uma importante proteína modulada por cálcio, sendo um mensageiro multifuncional ativado por cálcio. Uma vez ativada, ela pode participar como parte das vias de transdução de sinais mediadas pelo cálcio, através da modulação de quinases e fosfatases (VETTER; LECLERC, 2003).

A CaM liga-se diretamente em proteínas da membrana plasmática, incluindo os GPCRs, como os receptores μ -opioides, 5-HT1A para serotonina, receptores muscarínicos para acetilcolina, e receptores D₂ para dopamina (BOFILL-CARDONA et al., 2000; LUCAS, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a CaM também se liga a receptores A_{2A}, na porção proximal da terminação C-terminal (PIIRAINEN et al., 2015). Em um estudo de Boffil e colaboradores, foi demonstrado que a CaM, quando presente em uma proteína Gi nos receptores D₂, exerce um efeito inibitório sobre a proteína Gi, pois esta estaria presente no mesmo domínio envolvido na ativação deste receptor (BOFILL-CARDONA et al., 2000).

Alternativamente, poderíamos pensar que os receptores A_{2A} estariam facilitando a expressão dos receptores AT₁ na membrana celular. Existem relatos prévios de que processos de oligomerização ocorrem antes dos receptores serem expressos na membrana celular (PIN et al., 2005). Como por exemplo, Jones e colaboradores descreveram que a expressão do receptor GABA_{B1} na membrana celular é dependente de um processo de heterodimerização com o receptor GABA_{B2} no citosol (JONES et al., 1998). No entanto, são necessários estudos adicionais para investigarmos por qual destes mecanismos esta heterodimerização levaria a um aumento na liberação de cálcio pela angiotensina II, como demonstrado em nosso trabalho.

Contudo, dada a existência de múltiplas unidades (homodímeros e heterodímeros) com níveis variáveis de expressão celular em todos estes estudos, é difícil deduzir que os efeitos resultem de acoplamento alterado do heterodímero *per se* ou um *cross-talk* de sinalização adjacente.

Portanto, técnicas capazes de confirmar a presença da interação proteína-proteína *in situ*, tornam-se importantes ferramentas para a confirmação destes processos, como a técnica de PLA (TAURA; FERNÁNDEZ-DUEÑAS; CIRUELA, 2015). Esta técnica permite a detecção de interações de até ≤ 40 nm de distância (BRET ligações ≤ 10 nm) (TAURA; FERNÁNDEZ-DUEÑAS; CIRUELA, 2015). Nossos resultados demonstraram que ocorre uma co-localização dos receptores AT₁ e A_{2A} no estriado de camundongos, e ainda que existe uma heterodimerização destes receptores, como evidenciado pela técnica de PLA.

O estriado é considerado uma região com diversas funções, pois recebe projeções dos núcleos basais, além de diversas outras áreas encefálicas envolvidas com funções motoras e não motoras, como o córtex motor, o córtex pré-frontal, o hipocampo e o núcleo accumbens (FERRÉ et al., 2010; YAGER et al., 2015). Além disso, ele está envolvido

com processos patológicos como a DP. Contudo, tanto o sistema renina-angiotensina, quanto o sistema adenosinérgico, através dos seus receptores AT_1 e A_{2A} , apresentam um papel importante na modulação de diferentes funções do estriado. Ademais, já foram demonstrados processos de oligomerização dos receptores AT_1 e D_2 no estriado, sendo estes capazes de modular a neurotransmissão dopaminérgica (FERRÉ et al., 2008; MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2015). No entanto, foi demonstrado em um modelo animal da DP, que a heterodimerização (A_{2A}/D_2) nestes animais está reduzida, o que talvez estaria relacionado com uma hiperfuncionalidade dos receptores A_{2A} observado nesta doença (FERNANDEZ-DUENAS et al., 2015). Diante destas evidências e visando uma abordagem futura da modulação da interação AT_1/A_{2A} no contexto da DP, esta estrutura foi escolhida.

Como um dos principais neurotransmissores afetados na DP é a dopamina, investigamos se o tratamento com a losartana e o KW-6002 seriam capazes de modular este sistema e ainda se estes apresentariam efeito sinérgico. Como observado, tanto o bloqueio dos receptores AT_1 promovidos pela losartana, quando o bloqueio dos receptores A_{2A} promovidos pelo KW-6002, foram capazes de reduzir os movimentos involuntários da mandíbula (VCM) induzidos pela reserpina. Além disso, a coadministração de doses sub-efetivas dos dois antagonistas também foi capaz de reduzir os VCMs, sugerindo que estes fármacos estariam atuando de modo sinérgico.

Como descrito anteriormente, a reserpina é um modelo muito útil para o estudo de diversas alterações comportamentais. Porém, os VCMs vêm sendo abordados de maneira distintas por diferentes grupos de pesquisa, sendo que estes sintomas observados vêm sendo correlacionados a discinesias induzidas por antipsicóticos (WANG et al., 2015) ou pela L-dopa (AIA et al., 2011), ambos relacionados com uma intensa disfunção dopaminérgica. No entanto, como já descrito, a reserpina é também capaz de induzir a depleção de outros neurotransmissores, como a noradrenalina e serotonina (CSAKO, 2006; PETER et al., 1994).

É conhecido que o tratamento com a reserpina promove a autooxidação da dopamina e catabolismo oxidativo pela monoamina oxidase (MAO), estando estes eventos relacionados com o processo de estresse oxidativo, sendo encontrado efeito benéfico de substâncias antioxidantes nestes modelos (TREVIZOL et al., 2011; WANG et al., 2015). Como já descrito nos capítulos anteriores, o bloqueio dos receptores AT_1 apresentam um pronunciado efeito antioxidante, principalmente pelo bloqueio da NADPH oxidase (LIU et al., 2012a).

Efeito similar foi encontrado com antagonistas dos receptores A_{2A} , porém seus efeitos antioxidantes estariam relacionados com a redução de radicais livres e a peroxidação lipídica (NOBRE et al., 2010) .

Estudos demonstram que o bloqueio dos receptores A_{2A} é capaz de reverter os prejuízos motores observados em modelos animais da DP, incluído no modelo da reserpina (SHIOZAKI et al., 1999), sendo que estes efeitos estariam correlacionados com o processo de heterodimerização com os receptores D_2 para dopamina, levando a uma facilitação na liberação deste neurotransmissor (FERRÉ et al., 2008). Porém, quando observado o efeito dos antagonistas A_{2A} nas discinesias induzidas por L-dopa, os resultados são contraditórios, sendo que a utilização destes fármacos aumentaria o tempo de ação da L-dopa, porém em alguns estudos é relatado o aumentando das discinesias, enquanto em outros é demonstrando uma redução das discinesias (MORELLI et al., 2012). Estes resultados controversos encontrados na literatura podem estar relacionados, como mencionado anteriormente, pelo fato da L-dopa ser capaz de reduzir a formação de oligômeros, fazendo que alguns efeitos benéficos dessas interações sejam perdidos (PINNA et al., 2014).

O bloqueio dos receptores AT_1 também é capaz de reduzir as discinesias induzidas por L-Dopa em animais hemiparkinsonianos (MUÑOZ et al., 2014). Estes efeitos estariam sendo observados devido a uma redução dos processos neuroinflamatórios e por reduzir a angiogênese induzidos pelo tratamento crônico com L-Dopa (MUÑOZ et al., 2014). Porém, podemos supor que estes efeitos neste modelo também estariam relacionados ao fato dos receptores AT_1 , assim como os receptores A_{2A} , também serem capazes de formar dímeros com os receptores D_2 , modulando a liberação de dopamina (MARTÍNEZ-PINILLA et al., 2015). Entretanto, são necessários experimentos adicionais para uma melhor compreensão se este dímero trabalharia de maneira semelhante ao dímero A_{2A}/D_2

Observamos que o bloqueio dos receptores AT_1 em animais knockout para os receptores A_{2A} também é capaz de reverter os VCMs, inclusive utilizando uma dose sub-efetiva de losartana em animais selvagens. Estes resultados vão de acordo com os resultados que obtivemos do efeito sinérgico da administração de sub-doses dos antagonistas AT_1 e A_{2A} , uma vez que a ausência dos receptores A_{2A} facilitariam os efeitos do antagonista AT_1 , demonstrando que estes dois sistemas de neurotransmissão possuem uma atividade sinérgica. Porém, quando analisamos os níveis dos receptores AT_1 e A_{2A} , observamos que os animais knockout apresentam um maior nível dos receptores AT_1 , o

que também poderia contribuir para um efeito mais pronunciado da losartana nestes animais.

Contudo, são necessários experimentos adicionais para tentarmos compreender melhor o papel da interação AT_1/A_{2A} , principalmente em como este heterodímero estaria modulando a liberação de dopamina e noradrenalina depletados pela reserpina. Por fim, projetamos futuramente investigar a formação deste complexo AT_1/A_{2A} em diferentes áreas do SNC em processos neurodegenerativos, como observados no modelo da administração i.n. do MPTP.

4.10 Conclusão

Os resultados deste capítulo evidenciam pela primeira vez a formação de um heterômero entre os receptores para angiotensina II do tipo 1 e os receptores para adenosina do tipo A_{2A} . Além disso, este estudo fornece indícios de que este dímero estaria atuando de modo sinérgico no SNC, modulando o desenvolvimento de movimentos mandibulares involuntários induzidos pela reserpina em camundongos. Contudo, é necessária uma melhor compreensão da formação do oligômero AT_1/A_{2A} e se este pode representar de fato um novo alvo farmacológico para o tratamento de doenças do SNC.

5. Considerações finais

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo auxiliam na compreensão dos efeitos do bloqueio dos receptores AT_1 no contexto do envelhecimento e da DP, sendo que o tratamento com a losartana foi capaz de reverter ou prevenir prejuízos comportamentais em camundongos envelhecidos e submetidos ao modelo da administração i.n. de MPTP.

De maneira pioneira, demonstramos que os receptores AT_1 podem formar oligômeros com os receptores A_{2A} para adenosina, podendo no futuro, esta interação tornar-se um novo alvo farmacológico, pois em teoria, terapias multimodais seriam capazes de se ligar a diferentes segmentos dos receptores oligomerizados, possibilitando assim novas possibilidades terapêuticas em relação às terapias habituais. Contudo, são necessários experimentos adicionais para elucidação de como ocorrem os efeitos benéficos, tanto da losartana no SNC, como do heterômero AT_1/A_{2A} , para que no futuro possam se mostrar úteis no controle dos sintomas ou mesmo na prevenção da progressão de enfermidades.

6. Referências

- ABDALLA, S.; LOTHER, H.; QUITTERER, U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. **Nature**, v. 407, n. 6800, p. 94–98, 2000.
- AGNATI, L. F. et al. An integrated view on the role of receptor mosaics at perisynaptic level: focus on adenosine A(2A), dopamine D(2), cannabinoid CB(1), and metabotropic glutamate mGlu(5) receptors. **Journal of receptor and signal transduction research**, v. 30, n. 5, p. 355–69, Oct. 2010.
- AGUIAR, A. S. et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain research bulletin**, v. 79, n. 6, p. 452–7, 14 Aug. 2009.
- AGUIAR, A. S.; PREDIGER, R. D. . **Frontiers in Parkinson's Disease Research**. 1. ed. Florianopolis: Nova Science Publishers, Inc. (September 4, 2012), 2012.
- AIA, P. G. et al. Tardive dyskinesia. **Current treatment options in neurology**, v. 13, n. 3, p. 231–41, Jun. 2011.
- AL-MASHHADI, R. H. et al. Activation of A(2) adenosine receptors dilates cortical efferent arterioles in mouse. **Kidney international**, v. 75, n. 8, p. 793–9, Apr. 2009.
- ARORA, V. et al. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 10, p. 1570–81, Nov. 2011.
- ARRANG, J. M.; DRUTEL, G.; SCHWARTZ, J. C. Characterization of histamine H3 receptors regulating acetylcholine release in rat entorhinal cortex. **British journal of pharmacology**, v. 114, n. 7, p. 1518–1522, 1995.
- ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 1, p. 206–211, Dec. 2009.
- AVISSAR, S.; AMITAI, G.; SOKOLOVSKY, M. Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,

v. 80, n. 1, p. 156–9, Jan. 1983.

BADDELEY, A. Working memory. **Science**, v. 255, n. 5044, p. 556–559, 31 Jan. 1992.

BADDELEY, A. Working Memory: Theories, Models, and Controversies. **Annual Review of Psychology**, v. 63, n. 1, p. 1–29, 10 Jan. 2012.

BAJOR, G. Clinical significance of knowledge about the structure, function, and impairments of working memory. **Medical Science Monitor**, v. 19, p. 327–338, 2013.

BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science (New York, N.Y.)**, v. 217, n. 4558, p. 408–414, 1982.

BASSO, N. et al. Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 293, p. H1351–H1358, 2007.

BELLOT, M. et al. Dual agonist occupancy of AT1-R- α 2C-AR heterodimers results in atypical Gs-PKA signaling. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 4, p. 271–279, 2015.

BENICKY, J. et al. Angiotensin II AT(1) receptor blockade ameliorates brain inflammation. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, p. 857–870, 2011a.

BENICKY, J. et al. Angiotensin II AT1 Receptor Blockade Ameliorates Brain Inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 857–870, 8 Mar. 2011b.

BENIGNI, A. et al. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 3, p. 524–530, 2009.

BILD, W. et al. Inhibition of central angiotensin II enhances memory function and reduces oxidative stress status in rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 43, p. 79–88, Jun. 2013.

BISONG, S. A.; BROWN, R.; OSIM, E. E. Comparative effects of Rauwolfia vomitoria and chlorpromazine on locomotor behaviour and anxiety in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 334–9,

28 Oct. 2010.

BOFILL-CARDONA, E. et al. Binding of calmodulin to the D2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 42, p. 32672–80, 20 Oct. 2000.

BONDY, B. et al. Genetic variants in the angiotensin I-converting-enzyme (ACE) and angiotensin II receptor (AT1) gene and clinical outcome in depression. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 29, n. 6, p. 1094–9, Jul. 2005.

BORDNER, K. A. et al. Parallel declines in cognition, motivation, and locomotion in aging mice: Association with immune gene upregulation in the medial prefrontal cortex. **Experimental Gerontology**, Mar. 2011.

BOUVIER, M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 274–86, Apr. 2001.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and tissue research**, v. 318, n. 1, p. 121–34, Oct. 2004.

BRASZKO, J. J. Involvement of D1 dopamine receptors in the cognitive effects of angiotensin IV and des-Phe6 angiotensin IV. **Peptides**, v. 25, p. 1195–1203, 2004.

BRASZKO, J. J. Dopamine D4 receptor antagonist L745,870 abolishes cognitive effects of intracerebroventricular angiotensin IV and des-Phe6-Ang IV in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 85–91, Feb. 2009.

BRASZKO, J. J. Participation of D1-4 dopamine receptors in the pro-cognitive effects of angiotensin IV and des-Phe6 angiotensin IV. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, p. 343–350, 2010.

BROWN, D. C. et al. Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 118, p. 414–420, 1996.

BURGESS, N.; MAGUIRE, E. A.; O'KEEFE, J. The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. **Neuron**, v. 35, n. 4, p. 625–641, Aug. 2002.

BURNIER, M. et al. Salt-dependent renal effects of an angiotensin II

antagonist in healthy subjects. **Hypertension**, v. 22, n. 3, p. 339–47, Sep. 1993.

CABELLO, N. et al. Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. **Journal of neurochemistry**, v. 109, n. 5, p. 1497–507, Jun. 2009.

CANAS, P. M. et al. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 47, p. 14741–51, 25 Nov. 2009.

CARLSSON, A. Monoamine-depleting drugs. **Pharmacology & therapeutics. Part B: General & systematic pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 393–400, 1975.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200–1200, 30 Nov. 1957.

CARLSTRÖM, M.; WILCOX, C. S.; WELCH, W. J. Adenosine A2A receptor activation attenuates tubuloglomerular feedback responses by stimulation of endothelial nitric oxide synthase. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 300, n. 2, p. F457–64, Feb. 2011.

CARRUTHERS, S. P.; GURVICH, C. T.; ROSSELL, S. L. The muscarinic system, cognition and schizophrenia. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 393–402, Aug. 2015.

CARVALHO, R. . et al. Antidyskinetic effects of risperidone on animal models of tardive dyskinesia in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 60, n. 1-2, p. 115–124, Apr. 2003.

CASTRO, A. A. et al. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 208–215, Apr. 2012.

CFF, C. F. DE F.-. www.cff.org.br. 2015.

CHAI, S. Y. et al. The angiotensin IV/AT4 receptor. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 2728–2737, 2004.

CHEN, J.-F. Adenosine receptor control of cognition in normal and

disease. **International review of neurobiology**, v. 119, p. 257–307, 2014.

CHEN, J.-F.; ELTZSCHIG, H. K.; FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 4, p. 265–286, 28 Mar. 2013.

CHEN, L. et al. Novel insights into the behavioral analysis of mice subjected to the forced-swim test. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 4, p. e551–, 2015.

CHOW, L.-H. et al. Angiotensin IV possibly acts through PKMzeta in the hippocampus to regulate cognitive memory in rats. **Neuropeptides**, v. 53, p. 1–10, Oct. 2015.

CHRYSANT, S. G. The role of angiotensin II receptors in stroke protection. **Current Hypertension Reports**, v. 14, p. 202–208, 2012.

COOPER, W. O. et al. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 23, p. 2443–51, 8 Jun. 2006.

COURTNEY, S. M. An Area Specialized for Spatial Working Memory in Human Frontal Cortex. **Science**, v. 279, n. 5355, p. 1347–1351, 27 Feb. 1998.

COVINSKY, K. E. et al. Dysphoria and Anhedonia as Risk Factors for Disability or Death in Older Persons: Implications for the Assessment of Geriatric Depression. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 22, n. 6, p. 606–613, Jun. 2014.

CSAKO, G. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics: Digital Edition, 11th Edition: Edited by Laurence L Brunton PhD, John S Lazo PhD, Keith Parker MD PhD, Iain Buxton DPh, and Donald Blumenthal PhD. Published by The McGraw-Hill Companies, Inc. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 40, n. 6, p. 1218–1218, 23 May 2006.

CUMMINGS, J. L. Depression and Parkinson's disease: a review. **The American journal of psychiatry**, v. 149, n. 4, p. 443–54, Apr. 1992.

CUNEA, A.; POWNER, M. B.; JEFFERY, G. Death by color: differential cone loss in the aging mouse retina. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 11, p. 2584–2591, Nov. 2014.

CUNHA, R. A. et al. Evidence for functionally important adenosine A2a

receptors in the rat hippocampus. **Brain research**, v. 649, n. 1-2, p. 208–16, 27 Jun. 1994.

DARBIN, O. The aging striatal dopamine function. **Parkinsonism & related disorders**, v. 18, n. 5, p. 426–32, Jun. 2012.

DAVIS, C. J. et al. AT4 receptor activation increases intracellular calcium influx and induces a non-N-methyl-D-aspartate dependent form of long-term potentiation. **Neuroscience**, v. 137, n. 4, p. 1369–79, 2006.

DE LERA RUIZ, M.; LIM, Y.-H.; ZHENG, J. Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3623–50, 8 May 2014.

DECKER, M. W.; MCGAUGH, J. L. The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. **Synapse**, v. 7, n. 2, p. 151–168, Feb. 1991.

DEFAZIO, G. et al. The epidemiology of pain in Parkinson's disease. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 120, n. 4, p. 583–6, Apr. 2013.

DEL-BEL, E. et al. Nitric oxide, a new player in L-DOPA-induced dyskinesia? **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 7, p. 168–92, 2015.

DESAI, B. S. et al. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. **Cell transplantation**, v. 16, n. 3, p. 285–99, 2007.

DICKSON, D. W. et al. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. **Neurobiology of aging**, v. 16, n. 3, p. 285–98; discussion 298–304, 1995.

DIXON, A. K. et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 6, p. 1461–8, Jul. 1996.

DOMINGUEZ-MEIJIDE, A. et al. Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with l-DOPA. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 156–168, 2014.

DOTY, R. L. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: Is it viable? **Annals of Neurology**, v. 63, n. 1, p. 7–15, Jan. 2008.

ENWERE, E. et al. Aging results in reduced epidermal growth factor

receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 38, p. 8354–8365, 2004.

ERDOS, E. G. The ACE and I: how ACE inhibitors came to be. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 8, p. 1034–1038, 1 Jun. 2006.

FEIGIN, V.; RATNASABAPATHY, Y.; ANDERSON, C. Does blood pressure lowering treatment prevents dementia or cognitive decline in patients with cardiovascular and cerebrovascular disease? **Journal of the Neurological Sciences**, v. 229-230, p. 151–155, Mar. 2005.

FERGUSON, S. A.; CADA, A. M. Spatial learning/memory and social and nonsocial behaviors in the Spontaneously Hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rat strains. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 3, p. 583–594, Mar. 2004.

FERNANDEZ-DUENAS, V. et al. Untangling dopamine-adenosine receptor-receptor assembly in experimental parkinsonism in rats. **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, n. 1, p. 57–63, 1 Jan. 2015.

FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V. et al. Dopamine D2 receptor-mediated modulation of adenosine A_{2A} receptor agonist binding within the A_{2A}R/D₂R oligomer framework. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 1, p. 42–46, 2013.

FERRÉ, S. et al. Synergistic interaction between adenosine A_{2A} and glutamate mGlu₅ receptors: implications for striatal neuronal function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, p. 11940–5, 3 Sep. 2002.

FERRÉ, S. et al. An update on adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 15, p. 1468–74, 2008.

FERRÉ, S. et al. Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 443–53, Jun. 2010.

FERRÉ, S. The GPCR heterotetramer: challenging classical pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 145–152, Mar. 2015.

FERREIRA, J. M.; PAES-DE-CARVALHO, R. Long-term activation of adenosine A_{2A} receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of

avian retinal neurons. **Brain research**, v. 900, n. 2, p. 169–76, 11 May 2001.

FERREIRA, S. H. Angiotensin converting enzyme: History and relevance. **Seminars in Perinatology**, v. 24, n. 1, p. 7–10, 2000.

FLEEGAL-DEMOTTA, M. A.; DOGHU, S.; BANKS, W. A. Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT(1) receptor in brain endothelial cells. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 640–7, Mar. 2009.

FLEMING, S. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. **Experimental Neurology**, v. 187, n. 2, p. 418–429, Jun. 2004.

FLURKEY, K.; MCURRER, J.; HARRISON, D. Mouse Models in Aging Research. In: **The Mouse in Biomedical Research**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 637–672.

FORRESTER, S. J. et al. Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Mechanisms, Pathophysiology, and Potential Therapies in the Cardiovascular System. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 627–653, 6 Jan. 2016.

FREDHOLM, B. B. Adenosine—a physiological or pathophysiological agent? **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 3, p. 201–206, 22 Mar. 2014.

FREIS, E. D. Mental Depression in Hypertensive Patients Treated for Long Periods with Large Doses of Reserpine. **New England Journal of Medicine**, v. 251, n. 25, p. 1006–1008, 16 Dec. 1954.

FUXE, K. et al. Heterodimers and Receptor Mosaics of Different Types of G-Protein-Coupled Receptors. **Physiology**, v. 23, n. 6, p. 322–332, 1 Dec. 2008.

FUXE, K. et al. Dopamine heteroreceptor complexes as therapeutic targets in Parkinson's disease. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 19, n. 3, p. 377–398, 4 Mar. 2015.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, p. 224–236, 2008.

GARRIDO-GIL, P. et al. Involvement of PPAR- γ in the neuroprotective and anti-inflammatory effects of angiotensin type 1 receptor inhibition:

effects of the receptor antagonist telmisartan and receptor deletion in a mouse MPTP model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 38, 2012.

GARRIDO-GIL, P. et al. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. **Brain structure & function**, v. 218, n. 2, p. 373–88, Mar. 2013.

GAZOVA, I. et al. Spatial navigation—a unique window into physiological and pathological aging. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 4, p. 16, 2012.

GEORGE, S. R.; O'DOWD, B. F.; LEE, S. P. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 10, p. 808–20, Oct. 2002.

GLAESMER, H. et al. Age- and gender-specific prevalence and risk factors for depressive symptoms in the elderly: a population-based study. **International psychogeriatrics / IPA**, v. 23, n. 8, p. 1294–300, Oct. 2011.

GOMES, C. P. et al. Crosstalk between the signaling pathways triggered by angiotensin II and adenosine in the renal proximal tubules: Implications for modulation of Na⁺-ATPase activity. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 2033–2038, Nov. 2008.

GOZES, I. et al. The Expression of Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP) is Regulated by Brain Damage and Treatment of Mice with the ADNP Derived Peptide, NAP, Reduces the Severity of Traumatic Head Injury. **Current Alzheimer Research**, v. 2, n. 2, p. 149–153, 1 Apr. 2005.

GRAMMATOPOULOS, T. N. et al. Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. **Molecular neurodegeneration**, v. 2, p. 1, 2007.

GUBELLINI, P.; KACHIDIAN, P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. **Revue Neurologique**, v. 171, n. 11, p. 750–761, Nov. 2015.

GUÉRIN, D. et al. Noradrenergic neuromodulation in the olfactory bulb modulates odor habituation and spontaneous discrimination. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 4, p. 816–826, 2008.

GUIDOLIN, D. et al. Bioinformatics and mathematical modelling in the study of receptor-receptor interactions and receptor oligomerization: focus on adenosine receptors. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1808, n. 5, p. 1267–83, May 2011.

HAJJAR, I.; RODGERS, K. Do angiotensin receptor blockers prevent Alzheimer's disease? **Coc**, v. 28, p. 417–25, 2013.

HARUYAMA, N. et al. Improvement in spatial memory dysfunction by telmisartan through reduction of brain angiotensin II and oxidative stress in experimental uremic mice. **Life Sciences**, v. 113, n. 1-2, p. 55–59, Sep. 2014.

HASBI, A.; O'DOWD, B. F.; GEORGE, S. R. Dopamine D1-D2 receptor heteromer signaling pathway in the brain: emerging physiological relevance. **Molecular Brain**, v. 4, n. 1, p. 26, 2011.

HEADRICK, J. P. et al. Cardiovascular adenosine receptors: Expression, actions and interactions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 140, n. 1, p. 92–111, Oct. 2013.

HELLNER, K. et al. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 29, p. 427–435, 2005.

HENN, F. A.; VOLLMAYR, B. Stress models of depression: Forming genetically vulnerable strains. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 799–804, Jan. 2005.

HETTINGER, B. D. et al. Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. **The Journal of comparative neurology**, v. 431, n. 3, p. 331–46, 12 Mar. 2001.

HINCK, S. Historical perspective. **The American journal of nursing**, v. 111, p. 12–13, 2011.

HÖGLINGER, G. U. et al. A new dopaminergic nigro-olfactory projection. **Acta Neuropathologica**, v. 130, n. 3, p. 333–348, 14 Sep. 2015.

HOLDEN, H. M.; GILBERT, P. E. Less efficient pattern separation may contribute to age-related spatial memory deficits. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 4, p. 9, 2012.

ISMAIL, H. et al. Pleiotropic Effects of Inhibitors of the RAAS in the

Diabetic Population: Above and Beyond Blood Pressure Lowering. **Current Diabetes Reports**, v. 10, n. 1, p. 32–36, 19 Feb. 2010.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, Aug. 1999.

JACKSON LABORATORY. **LIFE SPAN AS A BIOMARKER**. Disponível em: <<https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>>.

JAY, T. M. et al. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. **Neurotoxicity research**, v. 6, n. 3, p. 233–44, 2004.

JEZOVA, M. et al. Angiotensin II AT 1 and AT 2 Receptors Contribute to Maintain Basal Adrenomedullary Norepinephrine Synthesis and Tyrosine Hydroxylase Transcription. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 2092–2101, May 2003.

JIANG, F. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. **Nature reviews. Cardiology**, v. 11, n. 7, p. 413–26, 2014.

JOGLAR, B. et al. The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: Relevance to progression of the disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, p. 656–669, 2009.

JONES, D. P. Redox theory of aging. **Redox Biology**, v. 5, p. 71–79, 2015.

JONES, K. A. et al. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 674–9, 17 Dec. 1998.

KADAR, H. et al. MALDI Mass Spectrometry Imaging of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) in Mouse Brain. **Neurotoxicity Research**, v. 25, n. 1, p. 135–145, 18 Jan. 2014.

KADOWAKI HORITA, T. et al. Effects of the adenosine A2A antagonist istradefylline on cognitive performance in rats with a 6-OHDA lesion in prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 230, n. 3, p. 345–52, Dec. 2013.

KASTER, M. P. et al. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic

stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 25, p. 7833–8, 23 Jun. 2015.

KATSUMATA, Y. et al. Metabolic syndrome and cognitive decline among the oldest old in Okinawa: in search of a mechanism. The KOCOA Project. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 67, n. 2, p. 126–34, Feb. 2012.

KERR, D. S. et al. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**, v. 179, p. 529–535, 2005.

KING, D. L. et al. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. **Behav Brain Res**, v. 103, n. 2, p. 145–162, 1999.

KIRKLAND, J. L. Translating the Science of Aging into Therapeutic Interventions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 3, p. a025908, 1 Mar. 2016.

KONINGS, C. H. et al. Increased angiotensin-converting enzyme activity in cerebrospinal fluid of treated patients with Parkinson's disease. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 231, p. 101–106, 1994.

KONISHI, K.; BOHBOT, V. D. Spatial navigational strategies correlate with gray matter in the hippocampus of healthy older adults tested in a virtual maze. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 5, p. 1, 2013.

KUCUK, M. et al. Effects of losartan on the blood–brain barrier permeability in long-term nitric oxide blockade-induced hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 71, n. 8, p. 937–946, Jul. 2002.

KUMAR, B. et al. Antidepressant and anxiolytic-like effects of 4n, a novel 5-HT3 receptor antagonist using behaviour based rodent models. **Indian journal of experimental biology**, v. 50, n. 9, p. 625–32, Sep. 2012.

KUMAR, J. Epidemiology of hypertension. **Clinical Queries: Nephrology**, v. 2, n. 2, p. 56–61, Apr. 2013.

KUTLU, M. G.; GOULD, T. J. Nicotinic modulation of hippocampal cell signaling and associated effects on learning and memory. **Physiology & Behavior**, v. 155, p. 162–171, Mar. 2016.

LABANDEIRA-GARCÃ-A, J. L. et al. Brain renin-angiotensin system

and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, n. July, p. 1–8, 2014.

LABANDEIRA-GARCIA, J. L. et al. Brain angiotensin and dopaminergic degeneration: relevance to Parkinson's disease. **American journal of neurodegenerative disease**, v. 1, n. 3, p. 226–44, 2012.

LAGERSTRÖM, M. C.; SCHIÖTH, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 4, p. 339–57, Apr. 2008.

LAI, E. Y. et al. Angiotensin II enhances the afferent arteriolar response to adenosine through increases in cytosolic calcium. **Acta Physiologica**, v. 196, p. 435–445, 2009.

LAZARONI, T. L. N. et al. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 1, p. 113–123, 2012.

LEES, A. J.; TOLOSA, E.; OLANOW, C. W. Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 30, n. 1, p. 19–36, Jan. 2015.

LENART, P.; KREJCI, L. DNA, the central molecule of aging. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 786, p. 1–7, Apr. 2016.

LERMAN, L. O. et al. Animal models of hypertension: An overview. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 3, p. 160–173, 2005.

LEVENS, N.; BEIL, M.; JARVIS, M. Renal actions of a new adenosine agonist, CGS 21680A selective for the A2 receptor. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 257, n. 3, p. 1005–12, Jun. 1991.

LEVY, R.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Segregation of working memory functions within the dorsolateral prefrontal cortex. **Experimental Brain Research**, v. 133, n. 1, p. 23–32, 20 Jul. 2000.

LI, D. et al. Binding of Losartan to Angiotensin AT1 Receptors Increases Dopamine D1 Receptor Activation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 3, p. 421–428, 1 Mar. 2012.

LI, N.-C. et al. Use of angiotensin receptor blockers and risk of dementia

in a predominantly male population: prospective cohort analysis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 340, p. b5465, 2010.

LI, W. et al. Inactivation of adenosine A2A receptors reverses working memory deficits at early stages of Huntington's disease models. **Neurobiology of disease**, v. 79, p. 70–80, Jul. 2015.

LIN, F. R. et al. Hearing loss prevalence and risk factors among older adults in the United States. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 66, n. 5, p. 582–90, May 2011.

LIN, J.-J. et al. Genetic polymorphism of the angiotensin converting enzyme and l-dopa-induced adverse effects in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 252, n. 2, p. 130–134, Jan. 2007.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 46–50, 1 Jan. 2010.

LIU, F. et al. The link between angiotensin II-mediated anxiety and mood disorders with NADPH oxidase-induced oxidative stress. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 28–35, 2012a.

LIU, H. et al. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via PI3K/Akt-mediated eNOS phosphorylation. **Brain Research Bulletin**, v. 89, n. 1-2, p. 65–70, 2012b.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. Hallmarks of Aging. v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013.

LOU, M. et al. Sustained Blockade of Brain AT1 Receptors Before and After Focal Cerebral Ischemia Alleviates Neurologic Deficits and Reduces Neuronal Injury, Apoptosis, and Inflammatory Responses in the Rat. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 24, n. 5, p. 536–547, May 2004.

LUCAS. Calmodulin Binding to Peptides Derived from the i3 Loop of Muscarinic Receptors. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 4, p. 647, 2006.

MAGGIO, R.; VOGEL, Z.; WESS, J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 7, p. 3103–7, 1 Apr. 1993.

MALATYNSKA, E. et al. Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 8, p. 552–564, Aug. 2012.

MARKS, L. S.; MAXWELL, M. H. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. **Hypertension**, v. 1, p. 384–388, 1979.

MARTÍNEZ-PINILLA, E. et al. Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. **Biochemical Pharmacology**, v. 96, n. 2, p. 131–142, Jul. 2015.

MARVAR, P. J. et al. The central nervous system and inflammation in hypertension. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 156–161, 2011.

MATHEUS, F. C. et al. Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behavioural brain research**, v. 235, n. 2, p. 263–72, 2012.

MATTSON, D. Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. **American Journal of Hypertension**, v. 14, n. 5, p. 405–408, May 2001.

MEDSCAPE. <http://www.medscape.com/viewarticle/834273>.
Medscape Medical News, 2014.

MEREDITH, G. E.; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 21, n. 10, p. 1595–1606, 2006.

MICHEL, M. C. et al. A Systematic Comparison of the Properties of Clinically Used Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 2, p. 809–848, 1 Apr. 2013.

MILLER, G. W. Paraquat: The Red Herring of Parkinson's Disease Research. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 1, p. 1–2, 13 Aug. 2007.

MILLIGAN, G. Applications of bioluminescence- and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4,

p. 397–405, Mar. 2004.

MOHAMED, R. A. et al. Role of adenosine A2A receptor in cerebral ischemia reperfusion injury: Signaling to phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase (pERK1/2). **Neuroscience**, v. 314, p. 145–59, 9 Feb. 2016.

MONTEFINESE, M. et al. Age-related effects on spatial memory across viewpoint changes relative to different reference frames. **Psychological Research**, v. 79, n. 4, p. 687–697, 19 Jul. 2015.

MORADGANJEH, A.; ZIAI, S. A.; ROGHANI, M. Losartan pretreatment reduces neurodegeneration and behavioural symptoms in 6-hydroxydopamine induced unilateral rat model of Parkinson's disease. **Pathophysiology**, v. 20, n. 4, p. 243–248, 2013.

MOREIRA, E. L. G. et al. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 12, p. 1337–1351, 8 Dec. 2010.

MORELLI, M. et al. A(2A) Receptor Antagonism and Dyskinesia in Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

MORENO, M. et al. Alteration of olfactory perceptual learning and its cellular basis in aged mice. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 3, p. 680–691, 2014.

MORGAN, J.; SETHI, K. D. Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 5, p. 263–265, 2005.

MORIN, N. et al. mGlu5, Dopamine D2 and Adenosine A2A Receptors in L-DOPA-Induced Dyskinesias. **Current neuropharmacology**, 1 Dec. 2015.

MOSKALEV, A. A. et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 661–684, 2013.

MS. Ministério da Saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br/>. 2014.

MULDOON, M. F. et al. Effects of six anti-hypertensive medications on cognitive performance. **Journal of hypertension**, v. 20, n. 8, p. 1643–52, Aug. 2002.

MUÑOZ, A. et al. Angiotensin type 1 receptor blockage reduces L -dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson ' s disease . Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 β . **Experimental Neurology**, v. 261, p. 720–732, 2014.

NAVARRO, G. et al. NCS-1 associates with adenosine A2A receptors and modulates receptor function. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 5, 2012.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 656–664, Feb. 2012.

NISHI, A. et al. Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A2A receptor signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 1322–7, 4 Feb. 2003.

NOBRE, H. V. et al. Caffeine and CSC, adenosine A2A antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochemistry International**, v. 56, n. 1, p. 51–58, Jan. 2010.

O'BRIEN, J. T. et al. Vascular cognitive impairment. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 2, p. 89–98, Feb. 2003.

OSSOWSKA, K.; LORENC-KOCI, E. Depression in Parkinson's disease. **Pharmacological reports : PR**, v. 65, n. 6, p. 1545–57, 2013.

OVERINGTON, J. P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A. L. How many drug targets are there? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 12, p. 993–6, Dec. 2006.

PAMPLONA, F. A. et al. Altered emotionality leads to increased pain tolerance in amyloid β (A β 1–40) peptide-treated mice. **Behavioural Brain Research**, v. 212, n. 1, p. 96–102, Sep. 2010.

PANG, T. et al. Telmisartan ameliorates lipopolysaccharide-induced innate immune response through peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation in human monocytes. **Journal of hypertension**, v. 30, n. 1, p. 87–96, Jan. 2012.

PENGAS, G. et al. The relationship of topographical memory performance to regional neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 4, p. 17, 2012.

PENNER, M. R.; MIZUMORI, S. J. Y. Age-associated changes in the

hippocampal-ventral striatum-ventral tegmental loop that impact learning, prediction, and context discrimination. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 4, p. 22, 2012.

PETER, D. et al. The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7231–7, 11 Mar. 1994.

PIIRAINEN, H. et al. Human Adenosine A2A Receptor Binds Calmodulin with High Affinity in a Calcium-Dependent Manner. **Biophysical Journal**, v. 108, n. 4, p. 903–917, Feb. 2015.

PIN, J.-P. et al. Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. **The FEBS journal**, v. 272, n. 12, p. 2947–55, Jun. 2005.

PINNA, A. et al. L-DOPA disrupts adenosine A2A–cannabinoid CB1–dopamine D2 receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies. **Experimental Neurology**, v. 253, p. 180–191, Mar. 2014.

PIZZAGALLI, D. A. Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model. **Annual review of clinical psychology**, v. 10, p. 393–423, 2014.

POPOLI, P. et al. Modulation of glutamate release and excitotoxicity by adenosine A2A receptors. **Neurology**, v. 61, n. 11 Suppl 6, p. S69–71, 9 Dec. 2003.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 21 Apr. 1977.

PREDIGER, R. D. S. et al. Genetic deletion or antagonism of kinin B1 and B2 receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 151, n. 3, p. 631–643, Feb. 2008a.

PREDIGER, R. D. S. et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 465–73, 8 Dec. 2008b.

PREDIGER, R. D. S. Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 20 Suppl 1, p. S205–20, 2010.

PREDIGER, R. D. S. et al. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 17, p. 114–129, 2010.

PREDIGER, R. D. S. et al. Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, v. 21, n. 1, p. 90–116, 2012.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats: Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 957–964, 2005.

PREDIGER, R. D. S.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R. N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioural pharmacology**, v. 16, n. 4, p. 209–18, Jul. 2005.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 159, n. 2, p. 197–205, Apr. 2005a.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural brain research**, v. 159, n. 2, p. 197–205, 30 Apr. 2005b.

RAGHAVENDRA, V.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S. K. Comparative studies on the memory- enhancing actions of captopril and losartan in mice using inhibitory shock avoidance paradigm. **Neuropeptides**, v. 35, n. 1, p. 65–69, Feb. 2001.

RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORÁN, B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. **Aging and Disease**, v. 6, n. 5, p. 349, 2015.

RASHID, A. J. et al. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 2, p. 654–9, 9 Jan. 2007.

REY, N. L. et al. Behavioral and cellular markers of olfactory aging and their response to enrichment. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 3, p.

626.e9–626.e23, Mar. 2012.

RICHARD JENNINGS, J. et al. Brain Function, Cognition, and the Blood Pressure Response to Pharmacological Treatment. **Psychosomatic Medicine**, v. 72, n. 7, p. 702–711, Sep. 2010.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **The American journal of physiology**, v. 156, n. 2, p. 261–73, Feb. 1949.

RODRIGUES, R. J. et al. Co-localization and functional interaction between adenosine A(2A) and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. **Journal of neurochemistry**, v. 92, n. 3, p. 433–41, Feb. 2005.

ROJAS-CORRALES, M. O. Antidepressant-Like Effect of tramadol and its Enantiomers in Reserpinized Mice: Comparative study with Desipramine, Fluvoxamine, Venlafaxine and Opiates. **Journal of Psychopharmacology**, v. 18, n. 3, p. 404–411, 1 Sep. 2004.

ROMERO, C. A.; ORIAS, M.; WEIR, M. R. Novel RAAS agonists and antagonists: clinical applications and controversies. **Nature Reviews Endocrinology**, 2015.

RONGEN, G. A. et al. Angiotensin AT1 receptor blockade abolishes the reflex sympatho- excitatory response to adenosine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 769–776, 1998.

ROSSATO, J. I. et al. Dopamine Controls Persistence of Long-Term Memory Storage. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 1017–1020, 21 Aug. 2009.

ROUSSELET, E. et al. Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. **Neurobiology of disease**, v. 14, n. 2, p. 218–28, Nov. 2003.

ROZENFELD, R. et al. AT1R-CB 1 R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 12, p. 2350–2363, 15 Jun. 2011.

ROZENFELD, R.; DEVI, L. A. Exploring a role for heteromerization in GPCR signalling specificity. **The Biochemical journal**, v. 433, n. 1, p. 11–8, 1 Jan. 2011.

SAAB, Y. B. et al. Renin–angiotensin-system gene polymorphisms and

depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 5, p. 1113–1118, Jun. 2007.

SAAVEDRA, J. M. Emerging features of brain angiotensin receptors. **Regulatory Peptides**, v. 85, p. 31–45, 1999.

SAAVEDRA, J. M. Brain angiotensin II: New developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, n. June, p. 485–512, 2005.

SAAVEDRA, J. M. Angiotensin II AT 1 receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. **Clinical Science**, v. 123, n. 10, p. 567–590, 1 Nov. 2012.

SALAHPOUR, A.; ANGERS, S.; BOUVIER, M. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 11, n. 5, p. 163–8, Jul. 2000.

SALAMONE, J.; BASKIN, P. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible model of parkinsonian tremor. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 53, n. 1, p. 179–83, Jan. 1996.

SALON, J. A.; LODOWSKI, D. T.; PALCZEWSKI, K. The Significance of G Protein-Coupled Receptor. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 4, p. 901–937, 2011.

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, p. 8258–8263, 2003.

SATHIYA, S. et al. Telmisartan attenuates MPTP induced dopaminergic degeneration and motor dysfunction through regulation of α -synuclein and neurotrophic factors (BDNF and GDNF) expression in C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 98–110, 2013.

SATOH, Y. et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 40, p. 10765–76, 2007.

SCHWARZBOLD, M. L. et al. Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. **Journal of neurotrauma**, v. 27, n. October, p. 1883–

1893, 2010.

SEIDEN, L. S.; CARLSSON, A. TEMPORARY AND PARTIAL ANTAGONISM BY L-DOPA OF RESERPINE-INDUCED SUPPRESSION OF A CONDITIONED AVOIDANCE RESPONSE. **Psychopharmacologia**, v. 4, p. 418–23, 20 Aug. 1963.

SHIOZAKI, S. et al. Actions of adenosine A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. **Psychopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 90–5, Nov. 1999.

SHOJI, H. et al. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. **Molecular Brain**, v. 9, n. 1, p. 11, 28 Dec. 2016.

SIRONI, L. Anti-Inflammatory Effects of AT1 Receptor Blockade Provide End-Organ Protection in Stroke-Prone Rats Independently from Blood Pressure Fall. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 3, p. 989–995, 30 Aug. 2004.

SKALISZ, L. L. et al. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression--Parkinson's disease association. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 26, n. 5, p. 879–83, Jun. 2002.

SKOV, J. et al. Tissue renin-angiotensin systems: A unifying hypothesis of metabolic disease. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. February, p. 1–7, 2014.

SKRBIC, R.; IGIC, R. Seven decades of angiotensin (1939–2009). **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1945–1950, Oct. 2009.

SNEL, J.; LORIST, M. M. Effects of caffeine on sleep and cognition. **Progress in brain research**, v. 190, p. 105–17, 2011.

STAESSEN, J. A.; RICHART, T.; BIRKENHAGER, W. H. Less Atherosclerosis and Lower Blood Pressure for a Meaningful Life Perspective With More Brain. **Hypertension**, v. 49, n. 3, p. 389–400, 1 Mar. 2007.

STORY, D. F.; ZIOGAS, J. Interaction of angiotensin with noradrenergic neuroeffector transmission. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 8, n. 7, p. 269–271, Jul. 1987.

SUZUKI, Y. et al. Effects of Losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on norepinephrine overflow and antidiuresis induced

by stimulation of renal nerves in anesthetized dogs. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 263, n. 3, p. 956–63, Dec. 1992.

SZAFRAN, K. et al. Potential role of G protein-coupled receptor (GPCR) heterodimerization in neuropsychiatric disorders: a focus on depression. **Pharmacological reports : PR**, v. 65, n. 6, p. 1498–505, 2013.

TAKAHASHI, R. N.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D. S. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 2614–32, 2008.

TAURA, J.; FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V.; CIRUELA, F. Visualizing G Protein-Coupled Receptor-Receptor Interactions in Brain Using Proximity Ligation In Situ Assay. In: **Current Protocols in Cell Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 17.17.1–17.17.16.

TCHEKALAROVA, J.; KAMBOUROVA, T.; GEORGIEV, V. Long-term theophylline treatment changes the effects of angiotensin II and adenosinergic agents on the seizure threshold. **Brain Research Bulletin**, v. 52, n. 1, p. 13–16, 2000.

TEBANO, M. T.; MARTIRE, A.; POPOLI, P. Adenosine A2A–cannabinoid CB1 receptor interaction: An integrative mechanism in striatal glutamatergic neurotransmission. **Brain Research**, v. 1476, p. 108–118, Oct. 2012.

THAKUR, S. et al. Inactivation of adenosine A2A receptor attenuates basal and angiotensin II-induced ROS production by Nox2 in endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 40104–40113, 2010.

TOTA, S. et al. Effect of angiotensin II on spatial memory, cerebral blood flow, cholinergic neurotransmission, and brain derived neurotrophic factor in rats. **Psychopharmacology**, v. 226, p. 357–369, 2013.

TREVIZOL, F. et al. Comparative study between two animal models of extrapyramidal movement disorders: prevention and reversion by pecan nut shell aqueous extract. **Behavioural brain research**, v. 221, n. 1, p. 13–8, 1 Aug. 2011.

TSENG, H.-C. et al. (-)Epigallocatechin-3-gallate prevents the reserpine-induced impairment of short-term social memory in rats. **Behavioural pharmacology**, v. 26, n. 8 Spec No, p. 741–7, Dec. 2015.

VANGUILDER, H. D. et al. Hippocampal dysregulation of synaptic

plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. **Neurobiology of Disease**, v. 43, n. 1, p. 201–212, Jul. 2011.

VETTER, S. W.; LECLERC, E. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 3, p. 404–414, Feb. 2003.

VILLAPOL, S. et al. Candesartan, an Angiotensin II AT1-Receptor Blocker and PPAR- γ Agonist, Reduces Lesion Volume and Improves Motor and Memory Function After Traumatic Brain Injury in Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2817–2829, 15 Dec. 2012.

VILLAR-CHEDA, B. et al. Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: Implications for progression of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. December 2009, p. 1695–1706, 2010.

VILLAR-CHEDA, B. et al. Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 7, p. 1726–1738, 2014.

VON BOHLEN UND HALBACH, O.; ALBRECHT, D. The CNS renin-angiotensin system. **Cell and Tissue Research**, v. 326, p. 599–616, 2006.

WANG, J. et al. Telmisartan ameliorates glutamate-induced neurotoxicity: Roles of AT 1 receptor blockade and PPAR γ activation. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 249–261, 2014.

WANG, M.-H. et al. (-) Epigallocatechin-3-gallate attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 131, p. 71–6, Apr. 2015.

WANG, Z. Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G Protein-Coupled Receptors: Recent Progress, Challenges and Future Research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 95, 12 Jan. 2016.

WAYNER, M. J. et al. Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. **Peptides**, v. 22, n. 9, p. 1403–14, Sep. 2001.

WOSIK, K. et al. Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 34, p. 9032–9042, 22 Aug. 2007.

WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. Brain renin-angiotensin-A new look

at an old system. **Progress in Neurobiology**, v. 95, p. 49–67, 2011.

WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions and implications for CNS diseases. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 465, p. 133–151, 2013.

YAGER, L. M. et al. The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. **Neuroscience**, v. 301, p. 529–541, Aug. 2015.

YAMADA, K. et al. Antidepressant-like activity of the adenosine A(2A) receptor antagonist, istradefylline (KW-6002), in the forced swim test and the tail suspension test in rodents. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 114–115, p. 23–30, Dec. 2013.

YU, K. et al. Angiotensin II regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the neuronal cultures of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Endocrinology**, v. 137, n. 8, p. 3566–76, Aug. 1996.

YUAN, Q. et al. Early odor preference learning in the rat: bidirectional effects of cAMP response element-binding protein (CREB) and mutant CREB support a causal role for phosphorylated CREB. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 11, p. 4760–5, 1 Jun. 2003.

ZHENG, C.; ZHANG, T. Synaptic plasticity-related neural oscillations on hippocampus–prefrontal cortex pathway in depression. **Neuroscience**, v. 292, p. 170–180, Apr. 2015.