

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ALEX DIAS ASSIS

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA REGENERAÇÃO AXONAL E
NA PLASTICIDADE MEDULAR APÓS LESÃO NERVOSA
PERIFÉRICA**

UBERLÂNDIA
2015

ALEX DIAS ASSIS

EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA REGENERAÇÃO AXONAL E NA
PLASTICIDADE MEDULAR APÓS LESÃO NERVOZA PERIFÉRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A848e Assis, Alex Dias, 1981-
2015 Efeito da angiotensina-(1-7) na regeneração axonal e na plasticidade
medular após lesão nervosa periférica / Alex Dias Assis. - 2015.
70 f. : il.

Orientadora: Renata Graciele Zanon.
Coorientadora: Fernanda de Assis Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Neurônios motores - Teses. 3. Sistema
renina-angiotensina - Teses. 4. Nervos periféricos - Doenças - Teses. I.
Zanon, Renata Graciele. II. Araújo, Fernanda de Assis. III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida, amor incondicional e por estar sempre comigo.

Agradeço aos meus mentores espirituais pela paciência, ensinamento, apoio e proteção.

Agradeço minha família pela paciência, orgulho e pelas orações que a mim destinaram.

Agradeço a minha esposa Cristianne, por todo amor, paciência e por toda compreensão e incentivo nos momentos de dificuldades.

Agradeço também a todo o pessoal do laboratório de fisiologia, neurociência e histologia, pelo apoio nas horas de necessidades. Em destaque, agradeço a equipe técnica do laboratório de fisiologia.

À minha orientadora, Renata eu agradeço pela oportunidade, paciência, dedicação e conhecimentos a mim proporcionado. E a minha co-orientadora Fernanda pela oportunidade, confiança e orientações.

Agradeço ao coordenador(a) e à secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas (PPGBC) pela boa condução dos aspectos que constituem o programa de pós-graduação.

A todos o meu muito obrigado por fazerem parte da conclusão de mais uma etapa na minha vida.

RESUMO

Após lesões nervosas periféricas, diversas modificações celulares e moleculares se desenvolvem para promover a regeneração axonal. Os axônios, desconectados dos seus respectivos corpos celulares, sofrem degeneração Walleriana. Produtos dessa degeneração são eliminados por células de Schwann e macrófagos. No SNC, os corpos celulares sofrem alterações denominadas respostas plásticas do neurônio e da glia, destacando-se o astrócito que apresenta importante papel nessa plasticidade. Estudos mostram que a Angiotensina-(1-7), um metabólito do Sistema Renina-Angiotensina, participa em ações centrais envolvendo aspectos comportamentais, aprendizado e memória, influenciando na neuroplasticidade. Nesse sentido, o presente trabalho investigou a recuperação funcional após lesão periférica do nervo isquiático em roedores tratados com a Ang-(1-7). Para tanto, realizou-se a lesão nervosa por esmagamento do nervo com preservação do epineuro. Durante duas semanas após lesão, foi realizado o teste do índice funcional do nervo isquiático que avalia a impressão plantar durante a marcha dos animais. Além disso, no nervo avaliou-se a regeneração axonal e a atividade das células de Schwann através de imunohistoquímica para neurofilamento e S-100. Diante dos resultados dessas técnicas consideramos que o tratamento com Ang-(1-7) interfere negativamente, possivelmente, atrasando as respostas das células de Schwann o que reflete uma menor organização axonal juntamente com um retorno funcional mais lento. As medulas lombares, onde se encontram os corpos neuronais que tiveram seus axônios lesados, também foram imunomarcados com GFAP, sinaptofisina e Mas, para avaliarmos respectivamente a atividade astrogial, a densidade sináptica e o receptor de Ang-(1-7). O tratamento com Ang-(1-7) mostrou na medula redução da atividade dos astrócitos e menor densidade sináptica após lesão. Ainda, foi observado que a expressão de Mas é alterada pela lesão axonal, mas o tratamento com Ang-(1-7) reduz essa expressão após duas semanas da lesão comparando-se os animais controles com os tratados. Dessa maneira, podemos concluir que o tratamento com Ang-(1-7) pode influenciar as respostas periféricas e centrais após lesão nervosa, aparentemente influenciando as células gliais responsáveis, pelo menos em parte, pela reação neuroinflamatória que ocorre diante do comprometimento axonal.

Palavras-chave: Mas, lesão em nervo periférico, neurônio motor

ABSTRACT

After peripheral nervous injuries several modifications cellular and molecular develop to promote axonal regeneration. The axons, disconnected from their cell bodies, suffer from Wallerian degeneration. Products of this degeneration are eliminated by Schwann cells and macrophages. In the CNS, in the cell bodies, changes called plastic responses of the neuron and glia occurs in the spinal cord, highlighting the astrocytes plays an important role in this plasticity. Studies have shown that Angiotensin-(1-7), a System Renin-Angiotensin metabolite, participates in actions involving central behavioral aspects, learning and memory, by influencing the neuroplasticity. In this sense, the present work investigated the functional recovery after peripheral lesion of the sciatic nerve in rodents treated with the Ang-(1-7). For that, we procedured with the nerve crushing injury, with preservation of the epineurium. During two weeks after injury, was carried out to test the functional index of the sciatic nerve that evaluates the footprint during gait of the animals. In addition, the nerve was assessed axonal regeneration and the activity of Schwann cells by immunohistochemistry for neurofilament and S-100. In front of these results, we believe that treatment with Ang-(1-7) interferes negatively, possibly, delaying the responses of Schwann cells, which reflects a less axonal organization together with a slower return of nerve function. The lumbar spinal cords, where are the neuronal cell bodies that had their axons injured, were also stained with GFAP, synaptophysin and Mas antisera, for assessing, respectively, the astroglial activity, synaptic density and the Ang-(1-7) receptor. The treatment with Ang-(1-7) showed, in the spinal cord, reduction of the astrocytic activity and lower synaptic density after injury. Also, it was observed that the expression of Mas is changed by axonal injury, but treatment with Ang-(1-7) reduces this expression after injury by comparing the control animals with the treated animals. In this way, we can conclude that the treatment with Ang-(1-7) can influence the peripheral and central responses after nerve injury, apparently influencing the glial cells responsible, at least in part, by neuroinflammation reaction that occurs after axonal damage.

Keywords: MAS, peripheral nerve injury, motor neuron.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenhos esquemáticos que ilustram motoneurônio intacto e axotomizado.....	13
Figura 2: Representação do Sistema Renina Angiotensina via clássica e via contra-reguladora (SRA).....	17
Figura 3: Esmagamento do nervo isquiático	25
Figura 4: Teste do índice funcional do nervo isquiático (SFI).....	26
Figura 5: Medidas utilizadas no cálculo do índice funcional do isquiático.....	27
Figura 6: Representação das mensurações realizadas para densidade de pixel nos anticorpos	29
Figura 7: Teste do índice funcional do isquiático (SFI).....	32
Figura 8: Imunomarcação anti-neurofilamento em cortes longitudinais do nervo isquiático.....	34
Figura 9: Imunomarcação anti-S-100 beta em cortes longitudinais do nervo isquiático.....	35
Figura 10: Imunomarcação anti-GFAP em cortes transversais da medula lombar.....	37
Figura 11: Gráfico da relação da densidade de pixel para a imunomarcação anti-GFAP entre os lados contralateral e ipsilateral.....	38
Figura 12: Gráficos da densidade de pixel para a imunomarcação anti-GFAP no lado contralateral e ipsilateral de cada grupo.....	38
Figura 13: Imunomarcação anti-sinaptofisina em cortes transversais da medula lombar.....	40
Figura 14: Gráfico da densidade de pixel para a imunomarcação anti-sinaptofisina.....	41
Figura 15: Gráfico da densidade de pixel para a imunomarcação anti-sinaptofisina no lado contralateral e ipsilateral de cada grupo.....	41
Figura 16: Imunomarcação anti-MAS em cortes transversais da medula lombar	43
Figura 17: Gráfico da relação da densidade de pixel para a imunomarcação anti-MAS entre os lados contralateral e ipsilateral de cada grupo.....	44
Figura 18: Gráfico da densidade de pixels para a imunomarcação anti-sinaptofisina no lado contralateral e ipsilateral de cada grupo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados e sua descrição.....	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANGII – Angiotensina II
ANG-(1-7) – Angiotensina-(1-7)
AT1- Receptor da Angiotensina II
AT2- Receptor da Angiotensina II
ATP – Trifosfato de Adenosina
BSA – Soro Albumina Bovina
CA – Cálcio
CS – Células de Schwann
CVLM – Área Caudal do Bulbo Ventrolateral
CA1 – Corno de Amon setor 1
CBEA – Centro de Bioterismo de Experimentação Animal
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
DAPI - 4',6'-diamidino-2-fenil-indol
DPM – Média Desvio Padrão
ETAR – Receptor Endotelial
EtBR - Brometo de etídio
GABA - Ácido Gama-aminobutírico
GAP-43 – Crescimento associado proteína 43
GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial
GLIA – Neuroglia
NACL – Cloreto de Sódio
MAS – Receptor da Angiotensina-(1-7)
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO – Óxido Nítrico
NTS – Núcleo Trato Solitário
PBS - Tampão Fosfato Salino
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PL – Comprimento de Impressão
PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α
RVLM – Área Rostral do Bulbo Ventrolateral
SFI – Índice Funcional do Isquiático

SNC – Sistema Nervoso Central

SRA – Sistema Renina Angiotensina

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

TS – Largura da Impressão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 <i>O sistema nervoso e sua resposta às lesões periféricas.....</i>	11
1.2 <i>Angiotensina-(1-7)</i>	16
1.3 <i>Efeitos pleiotróficos da Ang-(1-7).....</i>	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	22
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 <i>Animais.....</i>	24
3.2 <i>Procedimento cirúrgico: Esmagamento do nervo isquiático.....</i>	24
3.3 <i>Tratamento dos animais com angiotensina -(1-7).....</i>	25
3.4 <i>Análise do índice funcional do isquiático (SFI)</i>	26
3.5 <i>Imunohistoquímica.....</i>	27
3.6 <i>Análise Estatística.....</i>	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 <i>O tratamento com Ang-(1-7) pode interferir na recuperação funcional após lesão nervosa periférica.....</i>	31
4.2 <i>Nervos lesados de animais tratados com Ang-(1-7).....</i>	32
4.3 <i>Redução da astrogliose e menor densidade sináptica após tratamento com ANG-(1-7).....</i>	36
4.4 <i>Redução da imunomarcação para receptor Mas após tratamento com Ang-(1-7).....</i>	42
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXO 1.....	69
TERMO DE CONSENTIMENTO COMITÊ DE ÉTICA	

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Sistema Nervoso e sua resposta às lesões periféricas

O Sistema Nervoso é composto por diferentes tipos de células, os neurônios, a macroglia (astrócitos e oligodendrócitos), a microglia, os macrófagos perivasculares, que são as primeiras células a apresentarem uma resposta imune no Sistema Nervoso Central (SNC), as células endoteliais, as células ependimárias, que foram os ventrículos cerebrais, e as células que formam os envoltórios do Sistema Nervoso, as meninges (Machado, 1998; Kandel *et al.*, 2000).

Os astrócitos são o tipo mais abundante de célula glial (40-50% da glia) e caracterizam-se por possuírem inúmeros prolongamentos, restando pequena quantidade citoplasmática ao redor do núcleo, que pode ser esférico ou ovóide. Reconhecem-se dois tipos de astrócitos: os fibrosos, que apresentam prolongamentos lisos, longos e delgados, sem muitas ramificações e são encontrados na substância branca; e os protoplasmáticos, que possuem grande quantidade citoplasmática e grânulos, prolongamentos espessos e bastante ramificados, localizando-se somente na substância cinzenta. Os prolongamentos dos astrocitários protoplasmáticos relacionam-se intimamente com os corpos dos neurônios envolvendo as sinapses (Aldskogius *et al.*, 1999; Kandel *et al.*, 2000).

No microambiente medular, os neurônios motores ou motoneurônios apresentam contatos com a glia, dendritos e terminais sinápticos, sendo que aproximadamente metade de toda extensão da membrana de seu corpo celular apresenta-se coberta por projeções gliais, destacando-se os contatos com os astrócitos (Conradi, 1969). A média de comprimento de membrana ocupada com o contato sináptico varia de acordo com o tipo de terminal sináptico. Ao redor do corpo neuronal a superfície de membrana tem aproximadamente 35% de contato com terminais excitatórios glutamatérgicos, 12% com terminais inibitórios gabaérgicos e glicinérgicos e, 3% com terminais colinérgicos (Zanon e Oliveira, 2006), resultando em aproximadamente 50% do total da membrana do corpo neuronal coberta por sinapses (Conradi, 1969).

Qualquer mudança morfológica de um neurônio, especialmente de suas aferências, pode ter consequências importantes sobre suas funções e metabolismo. Essas alterações são frequentemente acompanhadas por um remodelamento da glia adjacente, e esta modificação do microambiente extracelular oferecerá um impacto direto sobre a atividade neuronal e na transmissão sináptica (Theodosius *et al.*, 2006).

O SNC é muito sensível a lesões e sua capacidade regenerativa é limitada. Assim, na maioria dos casos, o reparo tecidual não ocorre ou ocorre de forma incompleta, causando danos irreversíveis (Moran e Graeber, 2004). Para melhor compreensão dos mecanismos e limitações da regeneração do SNC, modelos de lesão nervosa foram propostos e estudados por diversos autores. Nesse contexto, modelos clássicos de lesão como a transecção ou esmagamento de nervo periférico do Sistema Nervoso Periférico, (Lieberman, 1971; Chen, 1978; Reisert *et al.*, 1984; Aldskogius e Svensson, 1993), a avulsão de raízes ventrais ou dorsais (Koliatsos *et al.*, 1994; Piehl *et al.*, 1995), a incisão no funículo ventral da medula (Risling *et al.*, 1983; Linda *et al.*, 1992) têm sido utilizados.

Nas lesões em que há perda da continuidade axonal, diversas modificações celulares e moleculares se desenvolvem imediatamente após a lesão com a finalidade de remover o segmento danificado e promover a regeneração axonal e assim, a recuperação do nervo (Burnnet e Zager, 2004). No segmento distal à lesão, os axônios, desconectados dos seus respectivos corpos celulares, juntamente com a bainha de mielina, iniciam um processo de degradação denominado degeneração Walleriana. Os produtos dessa degeneração são eliminados através de uma ação cooperativa das células de Schwann (CS) e macrófagos (Rodríguez *et al.*, 2004).

A perda do contato axonal faz com que as CS se diferenciem e assumam características fenotípicas de CS não-mielinizantes, indispensáveis para a regeneração do nervo. As CS não-mielinizantes atuam neste processo através da síntese de moléculas de adesão celular, fatores neurotróficos são responsáveis pela elaboração de uma membrana basal que contém várias proteínas da matriz extracelular, denominada banda de Büngner (Frostick *et al.*, 1998; Jessen & Mirsky, 2008). A banda de Büngner atua como um canal dentro do qual o crescimento axonal é guiado e as moléculas de adesão celular juntamente com os fatores neurotróficos são essenciais para o crescimento axonal no interior deste canal. As primeiras promovem orientação e adesividade dos axônios e CS, enquanto os fatores neurotróficos correspondem a agentes tróficos específicos que aumentam a regeneração nervosa periférica (Fu e Gordon, 1997; Frostick *et al.*, 1998).

Por outro lado, no coto proximal da lesão há o desenvolvimento do processo de regeneração axonal. Cada axônio envia um grande número de brotos que atravessam o local da lesão e continuam seu crescimento no interior das bandas de Büngner. Terminalmente em cada broto axonal, há a formação de um cone de

crescimento, que tem a função de explorar o ambiente através de movimentos constantes a fim de promover o direcionamento e acurácia da regeneração axonal em direção aos órgãos-alvo (Fawcett e Kaeynes, 1990; Lundborg, 2004).

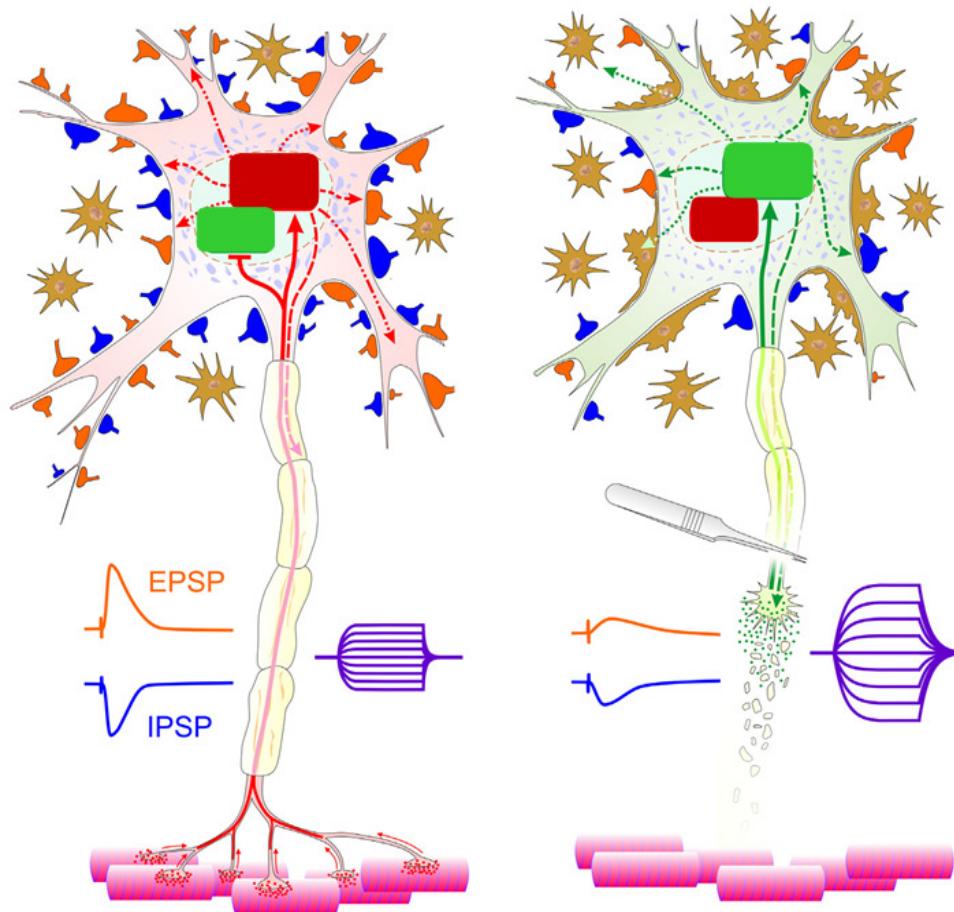


Figura 1 Desenhos esquemáticos que ilustram motoneurônio intacto e axotomizado.
(Fonte: González Forero, 2014).

O prognóstico da lesão nervosa periférica é variável e depende da integridade da membrana basal. Quando existe lesão significativa desta estrutura, que serve de arcabouço para o crescimento axonal em direção aos órgãos-alvo, os axônios regenerados assumem um crescimento tortuoso e formam brotos denominados de neuromas, cuja composição é dada por axônios imaturos e tecido cicatricial que forma uma barreira à regeneração (Fried *et al.*, 1991). No entanto, quando a membrana basal é preservada, a regeneração nervosa ocorre de forma satisfatória (Fawcett e Kaeynes, 1990). Neste caso, cada axônio do coto proximal passa a produzir uma grande quantidade de brotos que avançam distalmente em direção aos órgãos-alvo. Aqueles que formam uma conexão com o órgão terminal sobrevivem,

enquanto aqueles que não estabeleceram nenhuma conexão desaparecem (Burnnet e Zager, 2004).

A reinervação do órgão-alvo só é restabelecida após a regeneração completa do axônio e, no caso dos axônios motores esta reconexão com o músculo ocorre no antigo local de ligação, as placas motoras (Brushart, 1993). Porém, mesmo diante da habilidade regenerativa do Sistema Nervoso Periférico, a recuperação funcional após uma lesão é, em geral, insatisfatória devido a fatores intrínsecos e extrínsecos ao Sistema Nervoso, como o tipo e nível de lesão, presença de patologias associadas e alterações nos órgãos-alvo (Gordon e Boyd, 2003).

A axotomia de um nervo periférico causa uma resposta tecidual complexa no SNC. Esta resposta, que afeta tanto o corpo celular quanto o microambiente circunjacente dos motoneurônios axotomizados, manifesta-se através de alterações estruturais, metabólicas, eletrofisiológicas e moleculares (Moran e Graeber, 2004). O conjunto de alterações do corpo celular é denominado cromatólise e inclui: o edema do corpo celular, a retração de terminações sinápticas, o deslocamento do núcleo para a periferia da célula e a dissolução da substância de Nissl (Aldskogius e Svensson, 1993). Todas essas alterações são interpretadas como uma modificação do estado funcional dos neurônios lesados, passando de um modo de transmissão sináptica para um modo regenerativo em que a célula direciona seu metabolismo para a recuperação da lesão (Barron, 1998; Linda *et al.*, 1992; Piehl *et al.*, 1993; Piehl *et al.*, 1998).

Há 25 anos a glia não era considerada um componente importante do SNC. Até então, as funções gliais envolviam suporte, suprimento de nutrientes e remoção de fragmentos celulares. Novas descobertas em relação à diversidade de funções dos astrócitos e sua interação com as sinapses tem mudado o conceito até então aceito de que a função cerebral resultava exclusivamente da atividade neuronal (Pekny e Pekna, 2014). Os astrócitos são células excitáveis e baseiam sua capacidade de excitabilidade na variação da concentração de cálcio intracelular. Essa modulação é induzida pela liberação de neurotransmissores durante a atividade sináptica. Dessa forma, os astrócitos participam e modulam a informação sináptica, desafiando a clássica idéia de que a atividade sináptica era processada exclusivamente por neurônios (Pekny e Pekna, 2014).

Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram a variação na concentração de cálcio no interior de astrócitos (Perea e Araque, 2005; Deitmer e Rose, 2010). A

elevação de cálcio citosólico deve-se principalmente à mobilização do cálcio estocado no retículo endoplasmático. Essas oscilações podem ocorrer espontaneamente (Bezzi *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1998; Aguado *et al.*, 2002;) e podem ser disparadas pela liberação de neurotransmissores durante a transmissão sináptica, já que os astrócitos expressam grande variedade de receptores, revelando, dessa forma, a existência de uma comunicação entre neurônio e astrócito no SNC.

Os astrócitos também estão intimamente associados aos vasos sanguíneos e seus finos processos estão em contato com a face vascular. O processo de interação entre os astrócitos e as células endoteliais ocorre bilateralmente, pois as células endoteliais são fundamentais no papel de regulação e maturação dos astrócitos, que, por sua vez, participam da formação e manutenção da barreira hematoencefálica (Brujin *et al.*, 2004; Abbott *et al.*, 2006). Os astrócitos também apresentam ações na formação da cicatriz glial após uma lesão do SNC ou morte celular, respondendo rapidamente com o aumento de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (*glial fibrillary acidic protein*), fenômeno quase sempre relacionado à astrogliose reativa (Shrikant e Benveniste 1996).

Várias moléculas neuroativas, como o glutamato, serina-D, ATP, adenosina, GABA, TNF-alfa, prostaglandinas, proteínas e peptídeos são liberadas pelos astrócitos. Elas influenciam a fisiologia neuronal e as sinapses, e todas em conjunto recebem a denominação de gliotransmissores. Unindo os resultados de diversos trabalhos demonstrou-se que alguns desses gliotransmissores são liberados de forma cálcio-dependente, através de exocitose de vesículas ou lisossomos (Volterra e Meldolesi, 2005). Demonstrando mais uma vez a comunicação entre astrócito e neurônio, através da interação entre a modulação de cálcio e resposta astrocitária à atividade sináptica.

Além de suas amplas funções, bem como pela plasticidade de suas projeções citoplasmáticas, os astrócitos representam elementos fundamentais no processo de plasticidade sináptica após uma lesão nervosa (Aldskogius *et al.*, 1999). Paralelamente às alterações observadas nos motoneurônios axotomizados, os astrócitos também apresentam uma série de alterações metabólicas características, em conjunto denominada astrogliose ou astrogliose reativa (McCall *et al.*, 1996; Pekny, 2001), que inclui principalmente o aumento da expressão de GFAP, esta proteína é constituinte da rede de filamentos intermediários do citoesqueleto dos

astrócitos, presentes, portanto, no corpo celular e nas projeções astrocitárias (Tetzlaff *et al.*, 1988). Como a expressão da proteína GFAP é caracteristicamente aumentada em astrócitos próximos de motoneurônios lesados (Graeber e Kreutzberg, 2004; McCall *et al.*, 1996; Norton, 1999), esta se constitui num eficiente marcador de seus processos citoplasmáticos (Pekny, 2001).

Subsequentemente, ocorre um aumento da expressão de apolipoproteína J (Svensson *et al.*, 1995), PDGF (*platelet derived growth factor*) (Hermansson *et al.*, 1995), do receptor NMDA (Popratiloff *et al.*, 1996), e da proteína GAP-43 (Rohlmann *et al.*, 1994), que indicam um aumento da comunicação intercelular. Também ocorre um aumento da expressão de receptores de endotelina (ET_{AR} e ET_{BR}), que promovem uma concentração intracelular maior de íons Ca⁺⁺ (MacCumber *et al.*, 1990), induzem o efluxo de glutamato (Sasaki *et al.*, 1997), estimulam a síntese de mediadores inflamatórios, além de promover a organização do citoesqueleto de actina (Koyama e Baba, 1999), regulando a hipertrofia e hiperplasia astrocitária no SNC lesado (Rogers *et al.*, 2003).

1.2 Angiotensina-(1-7)

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é um sistema hormonal composto por várias enzimas, peptídeos ativos e inativos, que, juntos, desempenham importante papel na fisiologia cardiovascular por regular a pressão arterial e manter o balanço hidroeletrolítico. Classicamente, o angiotensinogênio produzido no fígado, é hidrolizado pela renina, liberada pelas células justaglomerulares renais, e produz um decapeptídeo denominado angiotensina I (Ang-I), a qual é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II (Ang-II) um octapeptídeo biologicamente ativo (Peach, 1977).

A Ang-II exerce inúmeros efeitos biológicos através da ativação de seu receptor AT₁, dentre as quais destacam-se: vasoconstrição, estímulo ao mecanismo da sede, liberação de aldosterona e vasopressina, aumento da reabsorção de sódio e água nos túbulos renais, hipertrofia celular, fibrose, inotropismo e cronotropismo positivos, formação de radicais de superóxido, ativação do sistema nervoso autônomo simpático, secreção de endotelinas, dentre outros (Santos *et al.*, 2008). A Ang-II também pode se ligar ao seu outro receptor AT₂ e exercer efeitos opostos aos do receptor AT₁. A ativação de AT₂ promove diferenciação celular, reparo tecidual,

apoptose, vasodilatação, inibição do crescimento e da proliferação celular (Carey, 2005).

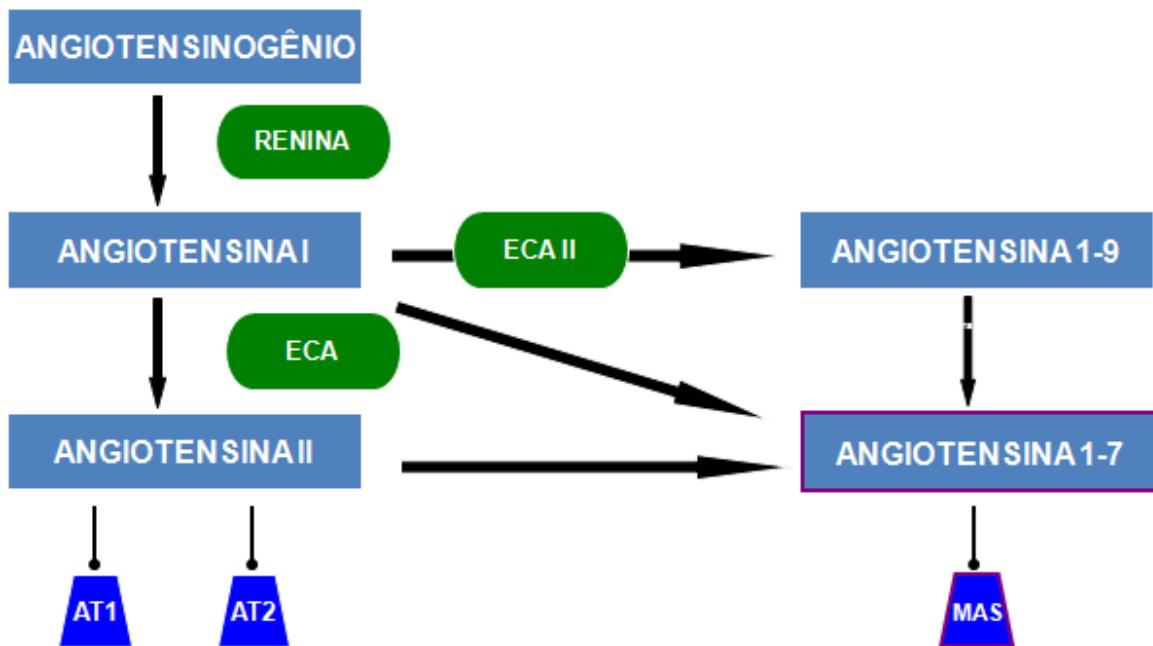


Figura 2: Representação do Sistema Renina Angiotensina: via clássica e via contra-reguladora (SRA).

A identificação de peptídeos biologicamente ativos, a descoberta de novas enzimas para o metabolismo de angiotensinas, de novos receptores angiotensinérgicos, de interações receptor-receptor e de novas funções do SRA e da atuação local deste sistema, independentemente de sua secreção hormonal, têm modificado a visão clássica do SRA (Ferrario *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008).

A Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um metabólito do SRA, que, por muito tempo, foi considerado inativo (Greene *et al.*, 1982). Esse conceito começou a se modificar a partir dos estudos de Schiavone *et al.* (1988) evidenciando que a Ang-(1-7) exercia um efeito semelhante ao da Ang II na liberação de vasopressina em culturas de extrato de neuro-hipófise. Desde então, diversos estudos têm demonstrado efeitos de grande importância e que produziram alterações conceituais de fundamental importância relacionadas à Ang-(1-7). Dentre eles destacam-se a descoberta da ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2) como a enzima responsável pela formação da Ang-(1-7) e a identificação do seu receptor endógeno denominado Mas (Santos *et al.*, 2003; Donoghue *et al.*, 2000).

A ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) tem efeitos antagônicos àqueles promovidos pela interação da Ang II com o receptor AT₁(Santos *et al.*, 2008, Pereira *et al.*, 2007, Tallant *et al.*, 2005). A primeira evidência de que a Ang-(1-7) podia ser gerada em áreas do Sistema Nervoso Central foi obtida em estudos de hidrólise da [¹²⁵I]-Ang I em homogenatos de cérebro. Homogenato de micropunções das áreas dorsomediais e ventrolaterais do bulbo de cão produziram a partir da [¹²⁵I]Ang I e da [¹²⁵I]Ang II, a [¹²⁵I]Ang-(1-7) (Santos *et al.*, 1988). Esse peptídeo era, nessa época, considerado um fragmento do SRA sem efeito biológico. No entanto, neste mesmo estudo foi observado que na presença do inibidor da ECA, ocorria bloqueio da produção da Ang II sem, contudo, afetar a produção da Ang-(1-7). Estes resultados mostraram, pela primeira vez, a independência da produção da Ang-(1-7) das vias clássicas do sistema SRA, e incentivaram a procura de ações da Ang-(1-7), tanto na periferia, como no SNC.

Vários estudos posteriores mostraram que a Ang-(1-7) age centralmente como um importante neuromodulador, especialmente em áreas bulbares envolvidas com o controle tônico e reflexo da pressão arterial (Averill *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2000). Além da participação da Ang-(1-7) no controle barorreflexo, a microinjeção deste peptídeo em outras áreas bulbares específicas produz importantes efeitos sobre a pressão arterial e freqüência cardíaca. Dentre essas áreas podemos citar o núcleo do trato solitário (NTS), onde está localizada a primeira sinapse das fibras barorreceptoras do SNC, área caudal do bulbo ventrolateral (CVLM) e área rostral do bulbo ventrolateral (RVLM), sendo esta última importante por conter os neurônios pré-motores que inervam os neurônios pré-ganglionares do Sistema Nervoso Simpático na coluna intermédio lateral (Dampney 1994).

Block e colaboradores em 1988 mostraram através de imunohistoquímica a presença da Ang-(1-7) em diversas áreas hipotalâmicas, incluindo os núcleos: paraventricular, supra-óptico, supraquiasmático e “*bed nucleus*” da estria terminal. A Ang-(1-7) também produz efeitos em várias dessas áreas hipotalâmicas. No núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), a Ang-(1-7) produz efeito neuronal excitatório comparável com o efeito da Ang II (Ambühl *et al.*, 1992) e induz aumento da atividade simpática renal (Silva *et al.*, 2005). Esses efeitos são abolidos pelo A-779, um peptídeo que se liga ao receptor Mas impedindo a ação da Ang1-7 (Ambühl *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2005). Em relação ao equilíbrio hidroeletrolítico a Ang-(1-7) estimula a liberação de vasopressina pelo eixo hipotálamo-hipofisário, equivalente

ao efeito produzido pela Ang II (Schiavone *et al.*, 1988). Calka e colaboradores em 1993 mostraram a colocalização da Ang-(1-7) e da óxido nítrico sintase nos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo, este resultado corrobora o potencial papel da Ang-(1-7) no controle do equilíbrio hidroeletrolítico através do eixo hipotálamo-hipofisário.

1.3 Efeitos pleiotróficos da Ang-(1-7)

Além da participação da Ang-(1-7) no controle da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrolítico, estudos na literatura mostram que a Ang-(1-7) participa também em ações centrais envolvendo aspectos comportamentais e de aprendizagem e memória. A administração central da Ang-(1-7) aumenta o comportamento de aprendizagem, memória e motilidade (Holy *et al.*, 1992). A Ang-(1-7) aumenta o potencial de longa duração na região CA1 do hipocampo (Hellner *et al.*, 2005) e na amígdala lateral de ratos. A modulação de potenciais de longa duração nessas áreas do cérebro está envolvida na plasticidade neuronal, influenciando os processos de aprendizagem e memória (Albrecht, 2007).

Estudos também demonstram a presença da Ang-(1-7) e localização anatômica do seu receptor Mas em gânglios da raiz dorsal onde se evidencia o receptor em neurônios sensitivos. Os resultados implicam que Ang-(1-7) e seu receptor Mas constituem um possível fator regulatório para informação sensorial, fornecendo evidências de antinocicepção periférica através da ativação de receptor Mas, independentemente de opiáceos (Costa *et al.*, 2012).

A administração central de Ang-(1-7) em ratos acometidos por isquemia cerebral é acompanhada pela redução da área infartada e melhora dos déficits neurológicos. O efeito anti-isquêmico está relacionado com aumento do suporte sanguíneo, redução do estresse oxidativo, aumento do aporte de fatores neurotróficos e uma resposta inflamatória atenuada (Mecca *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2013; Regenhardt *et al.*, 2013).

Guo e colaboradores 2010, mostraram que astrócitos expressam o receptor Mas na região ventrolateral na parte cranial do bulbo em modelos de ratos hipertensos. Nesse estudo é proposto que os astrócitos, na hipertensão, respondem de forma diminuída ao tratamento com Ang-(1-7) e, consequentemente, a atividade simpática é aumentada resultando em uma pressão arterial mais elevada. Fato

importante desse trabalho foi que os autores identificaram que a Ang-(1-7) influencia a atividade dos astrócitos.

Nesse sentido, conciliando dois diferentes aspectos: 1) a multifuncionalidade dos astrócitos, em especial seu envolvimento com a plasticidade após lesão nervosa e, 2) a presença no SNC bem como os diferentes papéis da Ang-(1-7) que mostram envolvimento desse peptídeo em plasticidade neuronal e nociceção, nosso questionamento tem como objetivo verificar o possível envolvimento da Ang-(1-7) e de seu receptor nas respostas periféricas e centrais do Sistema Nervoso após uma lesão axonal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A proposta deste trabalho é investigar o papel do peptídeo Ang-(1-7) e seu receptor Mas na plasticidade sináptica e na reatividade astrogial após lesão nervosa periférica.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o impacto da angiotensina-(1-7) sobre a recuperação funcional do nervo isquiático.
- Analisar o impacto da angiotensina-(1-7) sobre a recuperação axonal após lesão periférica.
- Estudar a resposta astrogial à angiotensina-(1-7) após lesão nervosa periférica.
- Investigar a influência da angiotensina-(1-7) na densidade sináptica após lesão periférica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos adultos machos (6 a 8 semanas de vida, 25g) pertencentes à linhagem C57BL selvagens (WT). Todos os experimentos com utilização de animais desse trabalho foram aprovados pelo Centro de Bioterismo de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU) sob o protocolo nº 109/12 (ANEXO A).

3.2 Procedimento cirúrgico: Esmagamento do nervo isquiático

Os animais foram divididos em quatro grupos com n=10 animais por grupo. Dois grupos, chamados de SHAM, sofreram o mesmo estresse cirúrgico dos animais efetivamente lesados no nervo periférico. Esse procedimento constituiu-se de incisão cirúrgica e rebatimento das camadas fasciais e musculares e subsequente exposição do nervo isquiático, em seguida, após o retorno de todos os tecidos, realizou-se a sutura da pele. Os outros dois grupos, denominados, AXOTOMIZADOS, passaram efetivamente pela lesão nervosa periférica (Figura 3).

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (1:1; 0,10ml/25g, i.p.) e submetidos ao esmagamento do nervo isquiático esquerdo próximo ao forame obturado. Com o auxílio de uma pinça nº 4, foi mantida pressão constante durante 10 segundos, sequencialmente, o procedimento foi repetido pelo mesmo período de tempo (Xin *et al.*, 1990). Um nó cirúrgico no tecido muscular adjacente ao local do esmagamento foi realizado para marcação do local a ser removido para análise. A pata contralateral ao lado lesado foi utilizada como controle.

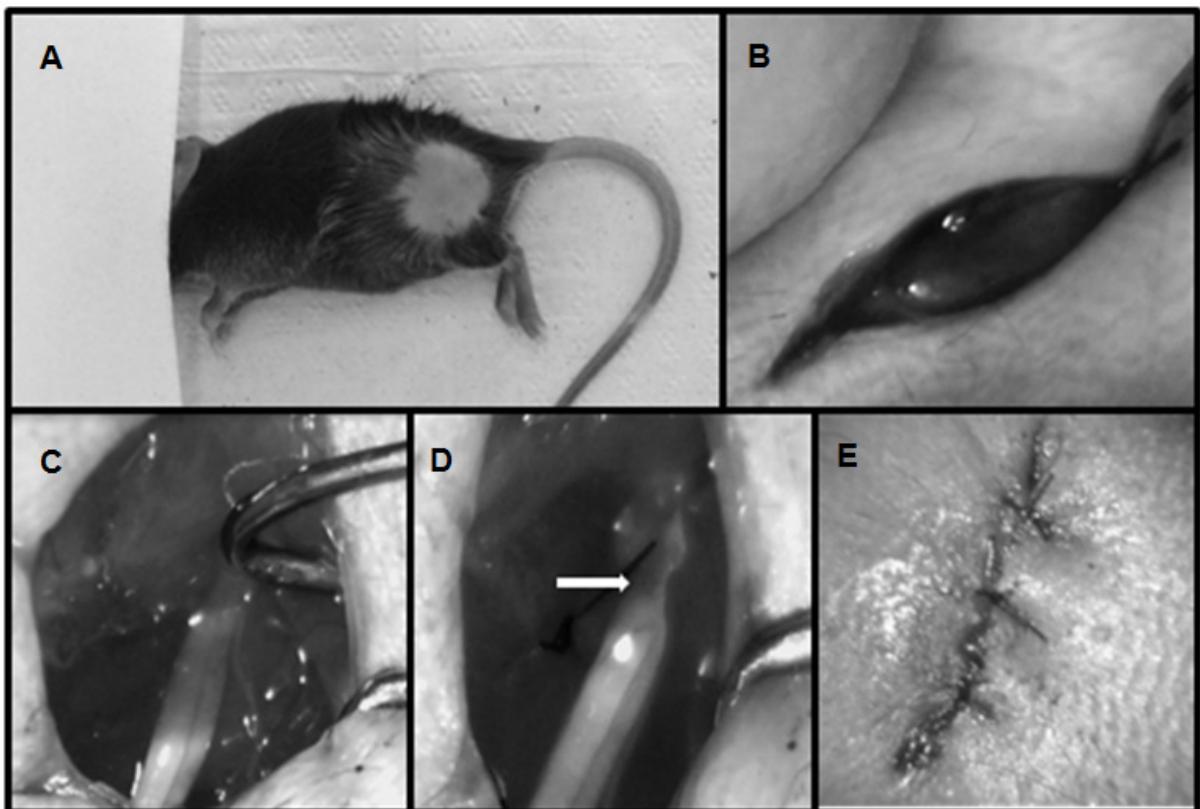


Figura 3: Esmagamento do nervo isquiático. Na figura **A** os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina, **B** incisão na coxa, **C** exposição do nervo isquiático, **D** flecha aponta o nervo esmagado e **E** sutura.

3.3 Tratamento dos animais com angiotensina-(1-7)

Os animais receberam injeções subcutâneas de 10ng de Ang-(1-7) em 100uL de salina (concentração de 100nM), desde o primeiro dia da cirurgia, por 14 dias, sempre no mesmo horário. Experimentos pilotos com três diferentes doses serviram como referência para escolha da dose efetiva. Os grupos C57BL-WT SHAM e AXOTOMIZADO TRATADOS foram tratados com variações de doses de 10, 30 e 100ng de Ang-(1-7)/100 uL e comparados através do teste do índice funcional do nervo isquiático com um grupo controle.

3.4 Análise do índice funcional do isquiático (SFI)

O protocolo seguido foi adaptado de Inserra *et al.* (1998). Os camundongos foram treinados uma semana antes da cirurgia a caminhar no aparato construído para a análise funcional com dimensões em centímetros (AxLxP) de 23x21x68cm. Foi realizada a coleta da impressão plantar pintando com tinta atóxica as patas do animal e posicionando o mesmo para caminhar em uma tira de papel 7,0 x 29,5 cm

colocada no corredor da caixa de avaliação projetada para esse experimento (Figura 4A). As análises foram realizadas nos seguintes tempos: três dias antes da cirurgia, 1 dia, 5 dias, 9 dias e 13 dias após o procedimento cirúrgico.

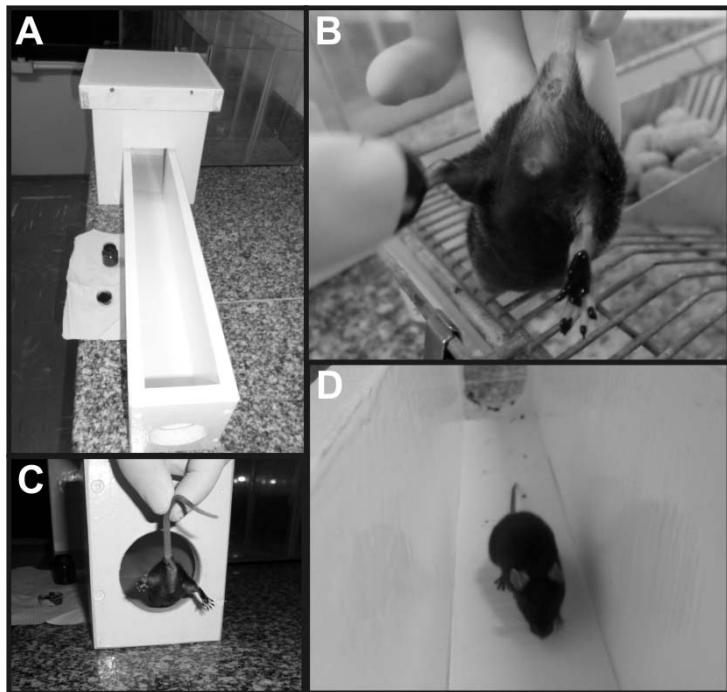


Figura 4: Teste do índice funcional do nervo isquiático (SFI). Em **A**, aparato para a análise funcional, **B** coleta da impressão plantar pintando com tinta atóxica, **C** posicionando o mesmo para caminhar em uma tira de papel e **D** camundongo caminhando para marcação das impressões.

As tiras contendo as impressões foram digitalizadas em *scanner* e analisadas utilizando o programa ImageJ 1.48V. Os dados referentes a cada animal foram identificados individualmente de modo a permitir o seguimento ao longo do tempo. Os parâmetros medidos nas impressões, tanto das patas normais como das patas afetadas, foram o comprimento da pegada (PL, *print length*) e a abertura total dos dedos (TS, *toe spread*). Essas medidas (Figura 5) foram colocadas na fórmula do cálculo do SFI e a pontuação obtida anteriormente à lesão foi considerada 100% da função, correspondendo, portanto à integridade do nervo e as demais pontuações obtidas no pós cirúrgico porcentagens relativas à pontuação inicial.



Figura 5: Medidas utilizadas no cálculo do índice funcional do isquiático (Fonte: Inserra *et al.* 1998). **SFI** índice funcional do isquiático, **ETS** abertura total dos dedos (*TS, toe spread*) lado experimental, **NTS** abertura total dos dedos (*TS, toe spread*) lado normal, **EPL** comprimento da pegada (*PL, print length*) do lado experimental e **NPL** comprimento da pegada (*PL, print length*) do lado normal.

3.5 Imunohistoquímica

Fundo os 14 dias de experimento, os animais foram anestesiados com a mesma mistura anestésica utilizada no procedimento cirúrgico e submetidos à eutanásia com aprofundamento da anestesia para realização de toracotomia e perfusão transcardíaca, respectivamente, com solução salina tamponada (20mL tampão fosfato com 0,9% de NaCl, 0,1M, pH 7,4; PBS) e solução fixadora (20mL de formaldeído 3,7%). Com auxílio de material cirúrgico adequado e lupa, foram extraídos os nervos isquiáticos de ambos os lados, contra e ipsilateral à lesão, e as medulas espinais lombares. Todo o material extraído foi mantido em solução fixadora por 12h em temperatura de 4°C.

Passado o período de fixação, o material foi desidratado em sacarose 20% e incluído em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congelado a -40°C em isopentano resfriado em nitrogênio líquido. Dos blocos congelados com o material, foram obtidos cortes histológicos transversais da medula e longitudinais dos nervos em criostato (-25°C, Microm, Heidelberg, Germany) com espessura de 10 µm. As secções foram então transferidas para lâminas gelatinizadas previamente climatizadas. As lâminas prontas, contendo os cortes histológicos de medula e nervo, foram estocadas a -20°C até a realização da técnica.

As lâminas foram colocadas em temperatura ambiente para a climatização, sendo então, imersas e lavadas por três vezes em PBS 0,01M. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com 150µl de solução de albumina bovina 5% em PBS 0,01M, pH 7,4 por 1h. Após este período, os anticorpos primários foram aplicados, com período de incubação de 18 a 24h sob temperatura

de 4°C em câmera úmida. Os anticorpos primários empregados estão apresentados na Tabela 1.

MEDULA	
Cabra anti-GFAP (1:50, Santa Cruz)	Proteína do citoesqueleto de astrócitos
Coelho anti-sinaptofisina (1:50, Dako)	Proteína presente nas vesículas de neurotransmissor nos terminais pré-sináticos
Camundongo anti-Mas (1:50, Laboratório de Hipertensão, UFMG)	Receptor Ang-(1-7)
NERVO	
Camundongo anti-neurofilamento (1:200, Sigma)	Proteína do citoesqueleto de axônios
Coelho anti-S100 beta (1:200, Santa Cruz)	Proteína de receptor cálcio dependente presente em células de Schwann

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados e sua descrição.

Em sequência à primeira incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M, pH 7,4 e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com partícula fluorescente (Alexa Fluor 488 ou 594, Jackson Laboratories, USA) por 1h protegidos da luz. Os espécimes foram lavados em PBS 0,01M, pH 7,4 e montados com lamínula em glicerol/PBS (1:1) contendo DAPI (4'-6'- diamino -2- fenil-indol) marcador citoquímico de núcleo que marca DNA. O material foi então observado e documentado utilizando-se um microscópio de fluorescência (TS-100, Nikon) acoplado à câmera fotográfica digital utilizando-se os filtros para fluoresceína (488nm) e rodamina (594nm).

Foi capturada uma imagem de cada lado da medula exatamente sobre o núcleo lateral do corno ventral da medula lombar onde se encontram os neurônios formadores do nervo isquiático, com objetiva de 20x, para cada animal. Da mesma forma, procedeu-se para os nervos direito e esquerdo de cada animal.

As imagens dos nervos foram analisadas qualitativamente enquanto as imagens das medulas foram usadas para quantificação da densidade de pixel com o auxílio do software IMAGEJ (versão 1.33u, *National Institutes of Health*, USA). Procedeu-se de forma sistemática para todas as imagens (Figura 6), dez mensurações foram feitas pontualmente ao redor dos grandes neurônios medulares,

sabidamente na literatura que esses grandes neurônios são considerados motores (Conradi, 1969). Foram medidos quatro neurônios para cada animal, sendo dois do lado ipsilateral e dois do lado contralateral à lesão.

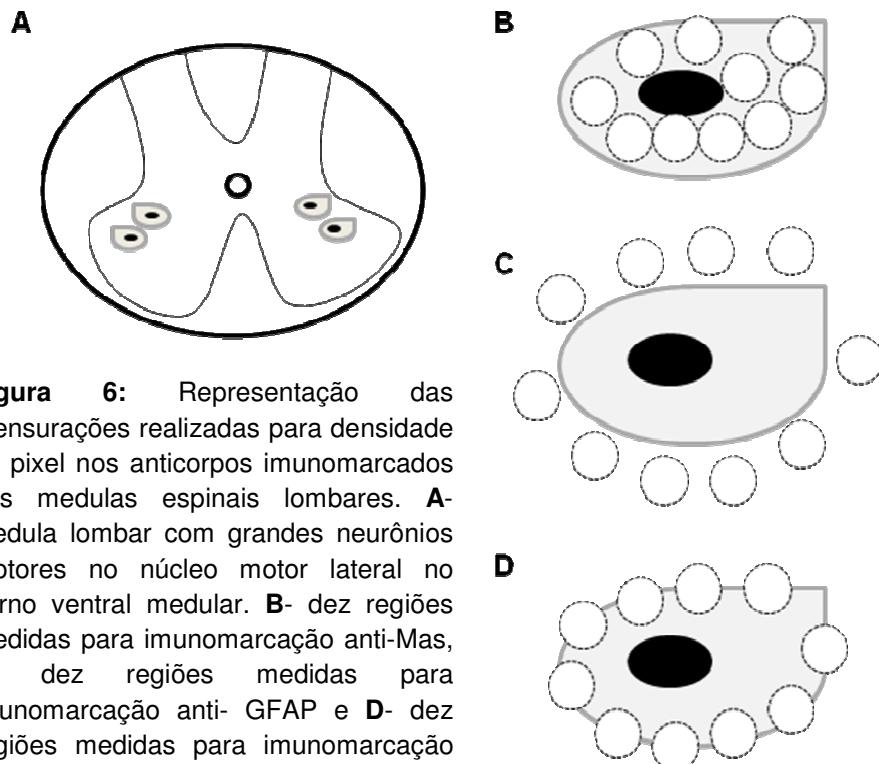


Figura 6: Representação das mensurações realizadas para densidade de pixel nos anticorpos imunomarcados nas medulas espinais lombares. **A-** Medula lombar com grandes neurônios motores no núcleo motor lateral no corno ventral medular. **B-** dez regiões medidas para imunomarcação anti-Mas, **C-** dez regiões medidas para imunomarcação anti- GFAP e **D-** dez regiões medidas para imunomarcação anti-sinaptofisina.

A partir da média das medidas dos dois neurônios de cada lado foi feito o cálculo da razão lado contralateral/lado ipsilateral para cada animal do grupo. Por fim, a média aritmética para cada grupo foi calcula e feita a comparação entre esses valores. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão (EP).

3.6 Análise Estatística

Foi realizada a análise descritiva primeiramente para analisarmos a distribuição de nossos dados numéricos. Diante dos resultados descritivos, escolheu-se o teste ANOVA um critério. Como pós-teste Student-Newman-Keuls adequado conforme necessidade dos dados para comparação entre os grupos para dados paramétricos e teste *U* de Mann Whitney para dados com distribuição não paramétrica. Assumiu-se para todos os testes comparativos níveis de significância de p [a,b,c] $p<0,05$, [d,e,f] $p<0,01$ e [g,h,i] $p<0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 O tratamento com Ang-(1-7) pode interferir na recuperação funcional após lesão nervosa periférica

Os animais suportaram bem a anestesia e todo o processo cirúrgico. Nenhum dos animais axotomizados, no início, se apoiava sobre a pata ipsilateral à lesão, apresentando a pata caída e os dedos em adução como resultados da disfunção do nervo isquiático. Gradualmente, com o passar das duas semanas analisadas após lesão, os animais recuperaram a capacidade de se apoiarem sobre o membro ipsilateral com abdução dos dedos. Ao todo, foram avaliadas 720 impressões plantares ipsilaterais e 720 contralaterais (4 grupos com n=10 x 6 testes durante as duas semanas de análise x 3 impressões plantares de cada lado por teste).

A Figura 7 mostra que todos os animais partem de uma avaliação da função do isquiático considerada normal ou íntegra (anteriormente ao procedimento cirúrgico), mostrada pelo pontuação de 100% da função preservada. Na avaliação apontada pelo número 1 (1 dia após a lesão), observa-se a perda total da função nos animais submetidos à axotomia (linhas azul e vermelha) enquanto os animais SHAM (linhas preta e verde) não apresentam variação da pontuação durante o período de análise. Observa-se melhora significativa no grupo axotomia controle a partir do teste 1 e no grupo axotomia tratado com Ang-(1-7) nota-se um pequeno retardo do processo de recuperação motora entre as avaliações 5 e 9, mostrada pela menor inclinação da curva quando comparado aos animais axotomizados controles. Comparando todos os testes entre os grupos axotomizados houve diferença estatisticamente significativa ($p <0.05$) no teste 9 (9º dia pós lesão).

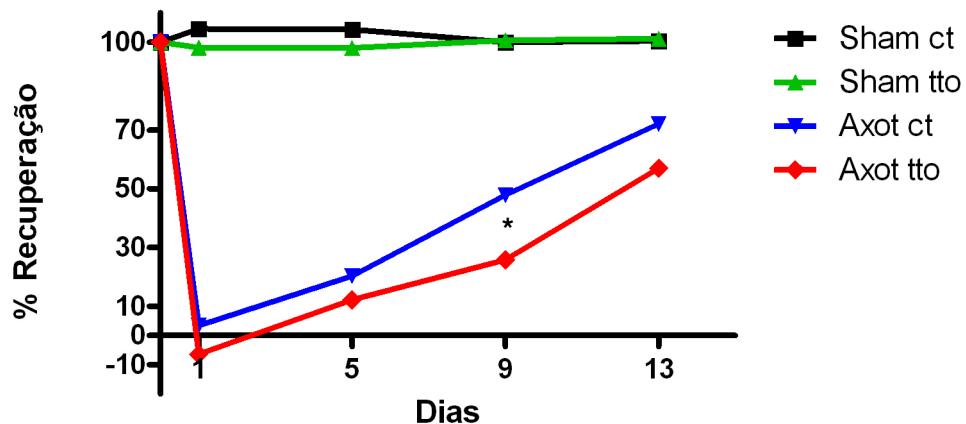


Figura 7: Teste do índice funcional do isquiático (SFI) que analisa a recuperação funcional após lesão do nervo. Onde o eixo x indica os dias de coleta da impressão plantar, sendo os pontos: 0, antes da lesão, 1º, 5º, 9º e 13º dia após a lesão. No eixo y, a porcentagem de recuperação funcional. Linhas de diferentes cores mostram os diferentes grupos: **preta** grupo sham controle, **verde** grupo sham tratado, **azul** grupo axotomia controle e **vermelha** grupo axotomia tratado. O asterisco (*) aponta a diferença estatística entre os pontos da 9º SFI.

4.2 Nervos lesados de animais tratados com Ang-(1-7) mostram desalinhamento dos axônios em recuperação juntamente com maior atividade das células de Schwann

As Figuras 8 e 9 mostram imunomarcações anti-neurofilamento e anti-S-100 beta, respectivamente, em cortes longitudinais dos nervos isquiáticos.

O neurofilamento constitui a terceira classe de filamentos intermediários dos neurônios, sendo encontrado principalmente no citoplasma dos axônios, sendo essenciais para a manutenção da forma e estabilização dos axônios. A proteína S-100 beta é uma proteína da família S-100 modulada pelo cálcio. A isoforma beta é a única encontrada nos nervos periféricos localizada nas células de Schwann. Essa proteína é altamente expressa após lesão nervosa, principalmente após a primeira semana, e está relacionada à ativação das células de Schwann de forma mais importante no coto proximal do nervo lesado (Spreca *et al.*, 1989). Dessa forma, a identificação da expressão dessas proteínas nos reporta a qualidade do processo de regeneração axonal tanto através da organização dos próprios axônios como pela reação das células de Schwann.

A imunomarcação anti-neurofilamento mostra aumento de expressão e disposição mais organizada dos neurofilamentos no grupo axotomizado controle

(Figura 8D) em que os axônios parecem mais paralelos e lineares em comparação com o grupo axotomia tratado com Ang-(1-7). Essa disposição das fibras nervosas em direção ao órgão-alvo é compatível com um processo regenerativo eficiente.

Na Figura 9, que apresenta a imunomarcação anti-S-100 beta notamos o aumento de expressão da proteína nos nervos lesados dos animais tratados com Ang-(1-7) após duas semanas da lesão. O que corresponde com uma maior atividade das células de Schwann. Enquanto que, para os animais axotomizados controles, as células de Schwann já apresentam redução da expressão de S-100 beta, aspecto mais adequado ao tempo pós lesão analisado (Spreca *et al.*, 1989).

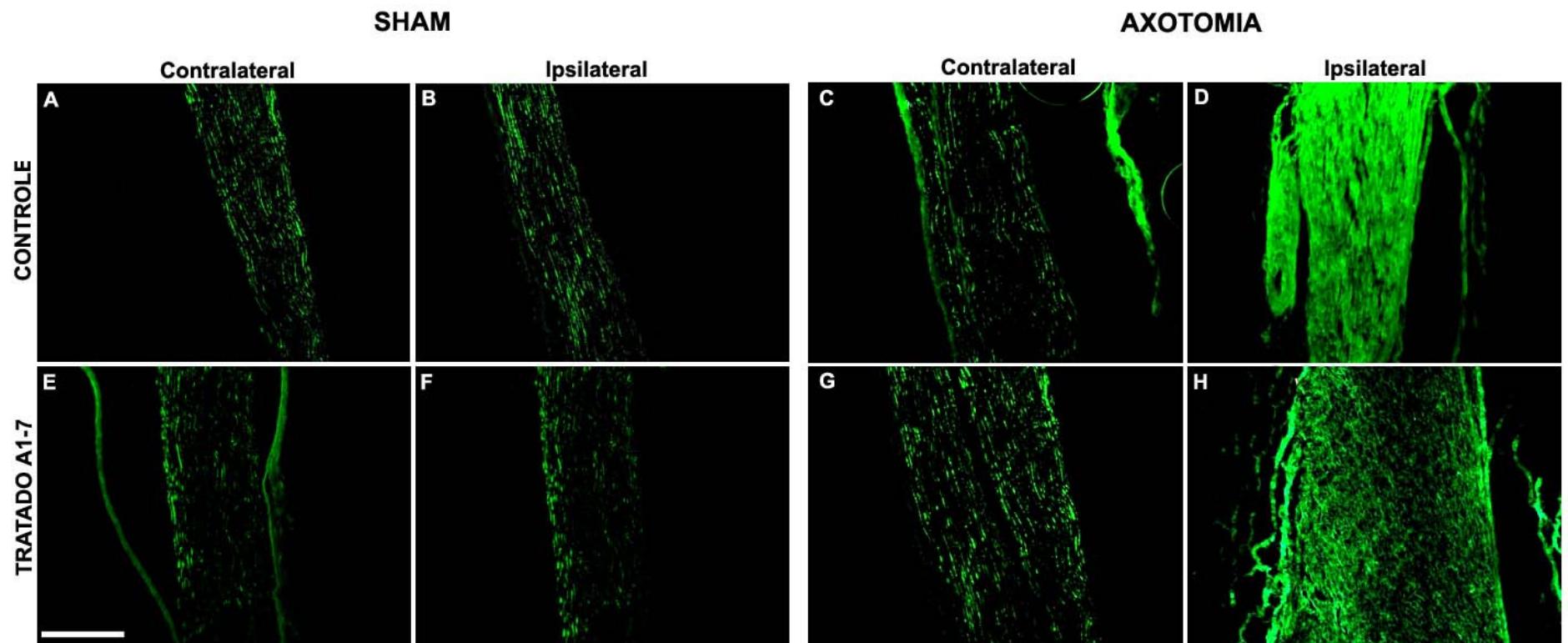


Figura 8: Imunomarcação anti-neurofilamento em cortes longitudinais do nervo isquiático. **A-D** grupos sham controles e axotomia controle. **E-H** grupos sham tratados com Ang-(1-7) e axotomia tratados com Ang-(1-7). Observe o aumento da imunomarcação do lado ipsilateral à lesão nos grupos axotomizados (**D e H**). Ainda, entre essas duas fotomicrografias, note diferença na organização dos axônios. Em **D**, lineares e paralelos. Escala = 100 μ m.

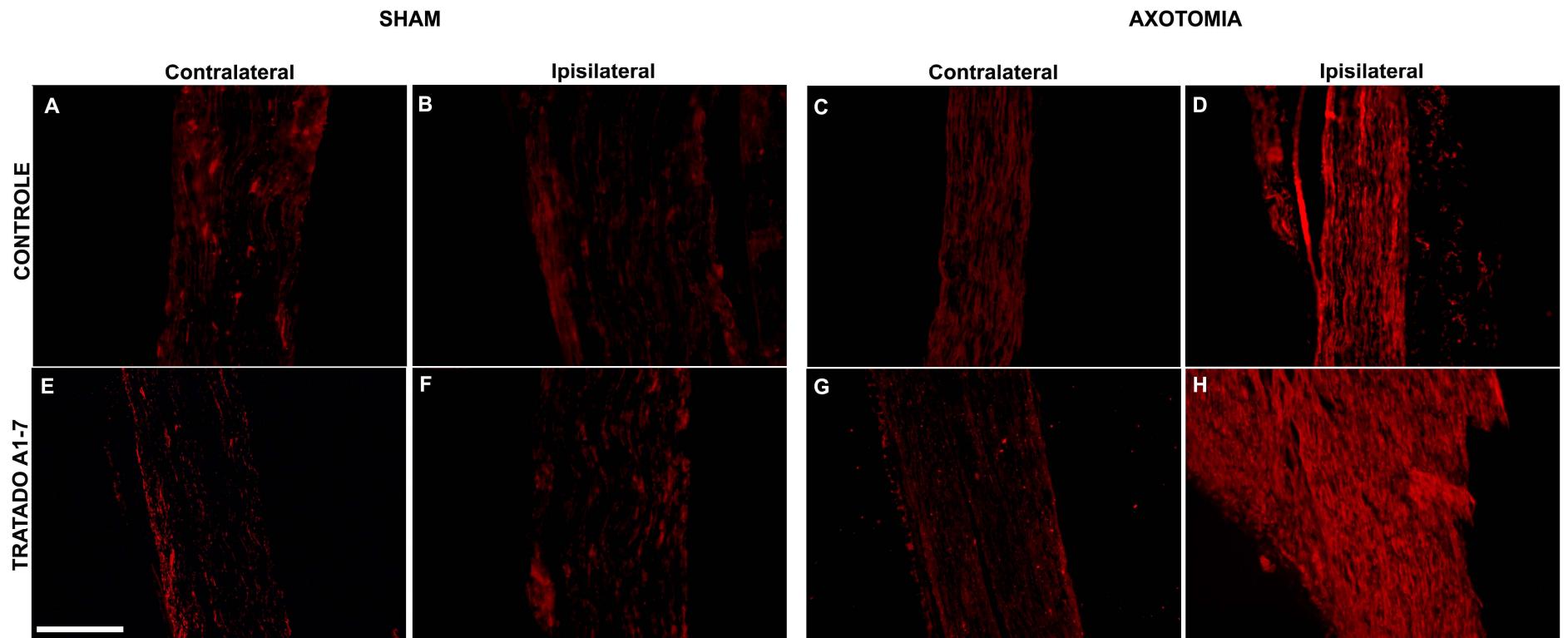


Figura 9: Imunomarcação anti-S-100 beta em cortes longitudinais do nervo isquiático. **A-D** grupos sham controles e axotomia controle. **E-H** grupos sham tratados com Ang-(1-7) e axotomia tratados com Ang-(1-7). Observe o aumento da imunomarcação do lado ipsilateral à lesão nos grupos axotomizados (**D e H**). Entre essas duas fotomicrografias, note que comparativamente em **H** tem-se maior expressão de S-100. Escala = 100 μ m.

4.3 Redução da astrogliose e menor densidade sináptica após tratamento com Ang-(1-7)

As imunomarcações a seguir (Figuras 10 e 13) mostram a resposta central à lesão tanto dos astrócitos (GFAP) como da densidade sináptica ao redor do corpo dos grandes neurônios do corno ventral da medula espinal lombar, através da expressão de sinaptofisina. Nas Figuras 10, 11 e 12, os resultados demonstram que quando há lesão, os astrócitos medulares do mesmo lado (ipsilateral) respondem com hipertrofia que é mostrado pelo aumento da expressão de GFAP (Figura 10D e H). Processo também notado mesmo nos animais SHAM (sem lesão do nervo). Neles, a lesão muscular (órgão alvo da inervação do isquiático) pode ter ocorrido durante a incisão cirúrgica para a exposição do nervo, provocando uma pequena resposta astroglial na medula (Figura 10B e F).

O aumento do GFAP, em relação ao lado contralateral, é levemente maior para os animais axotomizados controle em relação aos axotomizados tratados (Figura 12). No entanto, quando comparamos somente o lado esquerdo, ipsilateral à lesão, desses grupos, nota-se a resposta glial显著mente reduzida com o tratamento de Ang-(1-7) (Figura 12).

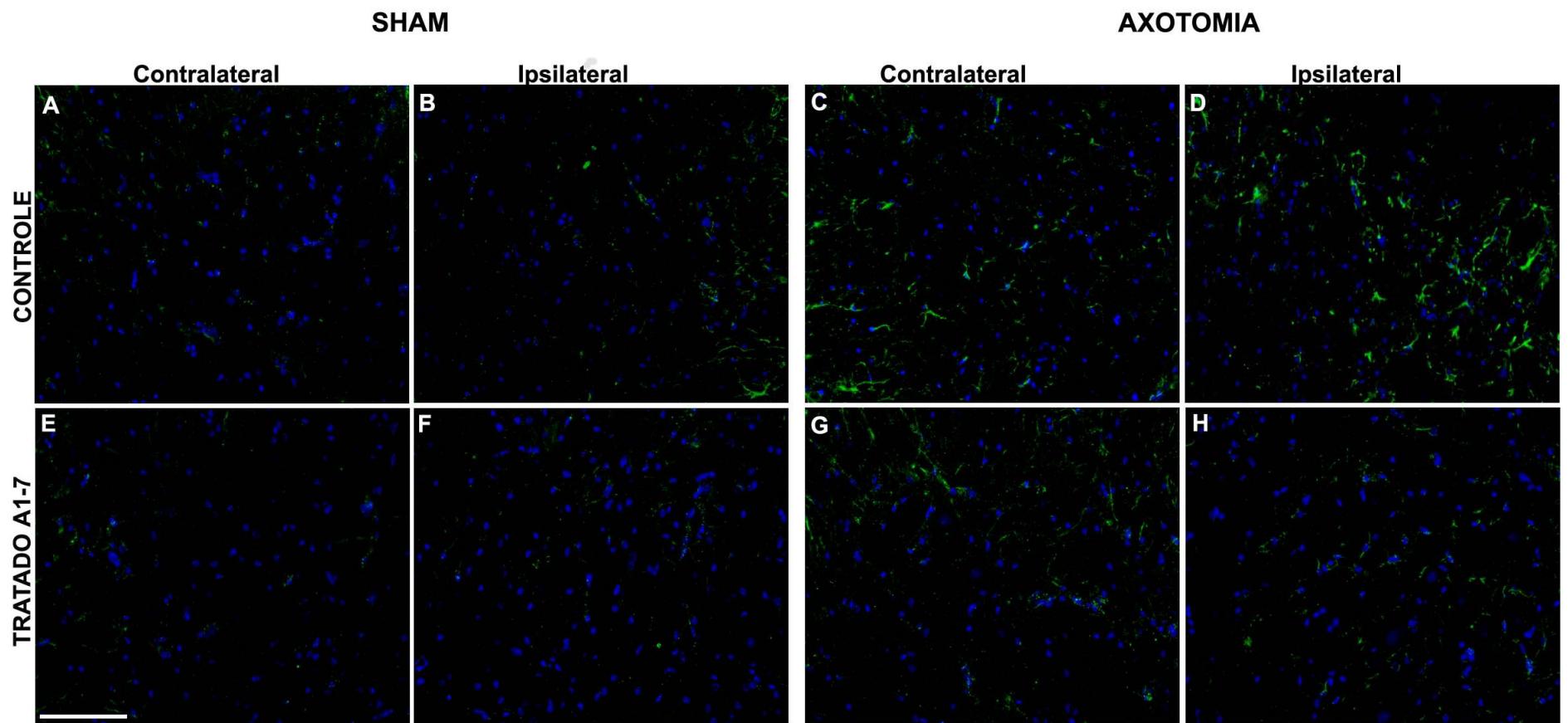


Figura 10: Imunomarcação anti-GFAP em cortes transversais da medula lombar no núcleo motor lateral do corno ventral. **A-D** grupos controle, sham e axotomia. **E-H** grupos tratados com Ang-(1-7), sham e axotomia. Observe o aumento da imunomarcação dos grupos controles **A-D** especialmente em **D**, mostrando maior expressão de GFAP. Note que o tratamento com Ang-(1-7) diminui a expressão de GFAP em **E-H**. Escala = 100μm.

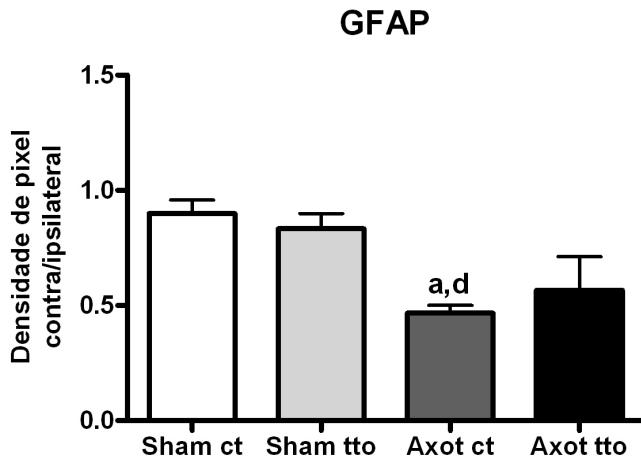


Figura 11: Gráfico da relação da densidade de pixel da imunomarcação anti-GFAP entre os lados contralateral e ipsilateral de cada grupo no corno ventral da medula lombar. ANOVA 1 critério com pós-teste Student-Newman-Keuls. [a] em relação a primeira barra e [d] em relação a segunda barra, [a] $p < 0,05$ vs sham ct e [d] $p < 0,05$ vs Sham tto.

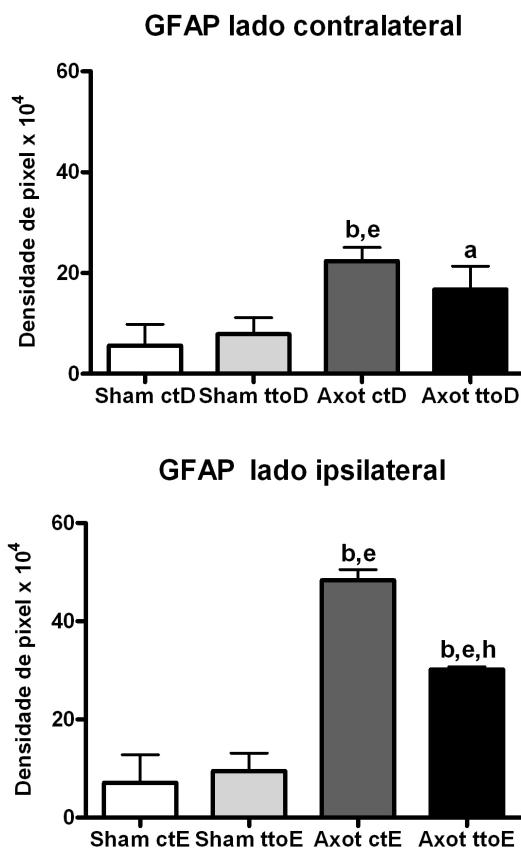


Figura 12: Gráficos da densidade de pixel para a imunomarcação anti-GFAP no lado contralateral e ipsilateral de cada grupo no corno ventral da medula lombar. Testes *U* de Mann Whitney. [a-b] em relação a primeira barra, [e] em relação a segunda barra e [h] em relação a terceira barra) **Lado contralateral:** [a] $p < 0,05$ vs sham ct; [b] $p < 0,01$ vs sham ct; [e] $p < 0,01$ vs sham tto. **Lado ipsilateral:** [b] $p < 0,01$ vs sham ct; [e] $p < 0,01$ vs Sham tto; [h] $p < 0,01$ vs axot ct.

Em relação à imunorreatividade para a proteína sinaptofisina (Figura 13), duas semanas após lesão, foi identificada uma diminuição significativa na expressão da proteína, traduzindo a menor cobertura sináptica em relação aos corpos de motoneurônios, nos animais dos grupos axotomia tratado e controle. A redução da densidade sináptica é esperada após axotomia periférica e, no presente trabalho, o tratamento com Ang-(1-7) após lesão axonal parece promover uma maior perda dos contatos sinápticos proporcionalmente ao lado íntegro da medula quando comparado aos animais axotomizados controle (Figura 14 e 15).

Quando analisamos separadamente os lados contra e ipsilateral dos grupos, mostramos que estatisticamente os valores médios de expressão de sinaptofisina são semelhantes entre todos os animais (Figura 15, primeiro gráfico). Nos lados ipsilaterais à lesão dos animais axotomizados controle e tratado podemos notar que ocorre uma tendência para uma menor densidade sináptica com o tratamento de Ang-(1-7) (Figura 15, segundo gráfico), apesar de não ocorrer diferença estatística entre os valores.

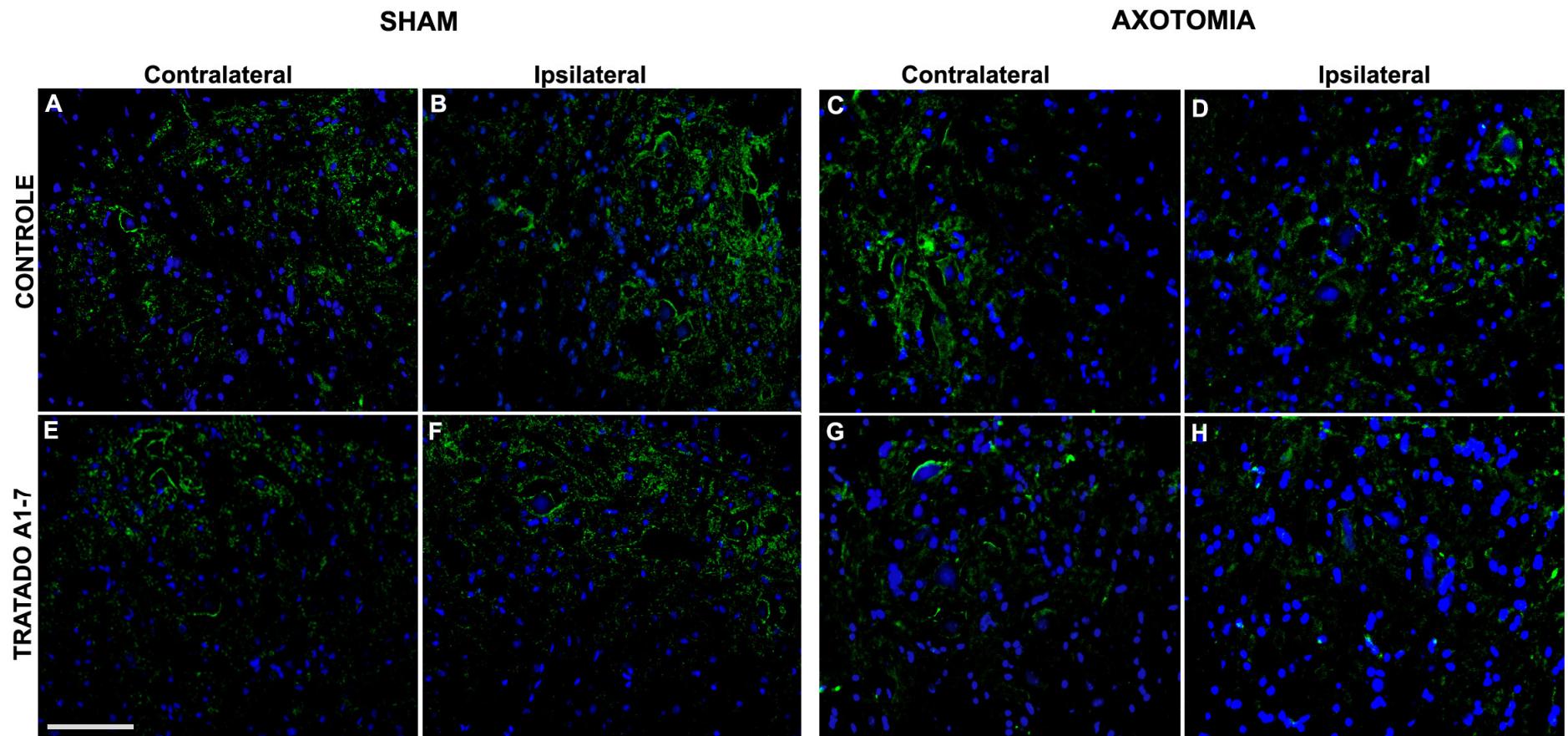


Figura 13: Imunomarcação anti-sinaptofisina em cortes transversais da medula lombar no núcleo motor lateral do corno ventral . **A-D** grupos controle, sham e axotomia. **E-H** grupos tratados com Ang-(1-7), sham e axotomia. Note que o tratamento com Ang-(1-7) não alterou o padrão basal da expressão de sinaptofisina nos animais SHAM. Observe em **D** e **H** a diminuição da expressão de sinaptofisina devido às lesões provocadas nos axônios de neurônios motores. Escala = 100 μ m

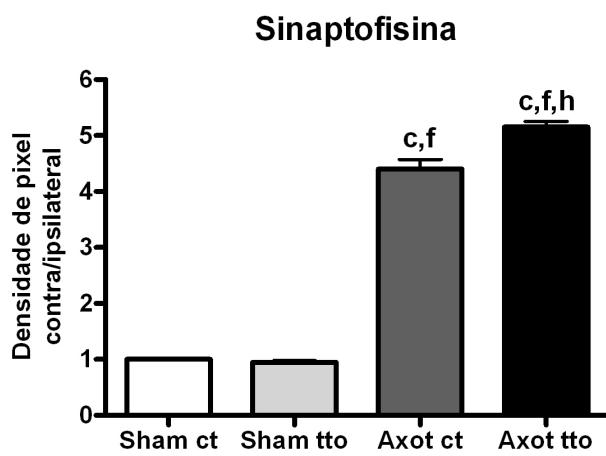


Figura 14: Gráfico da relação da densidade de pixel para a imunomarcação anti-sinaptofisina entre os lados contralateral e ipsilateral de cada grupo no corno ventral da medula lombar. ANOVA 1 critério com pós-teste Student-Newman-Keuls. [c] em relação a primeira barra, [f] em relação a segunda barra e [h] em relação a terceira barra) [c] $p < 0,001$ vs sham ct; [f] $p < 0,001$ vs sham tto; [h] $p < 0,01$ vs axot ct.

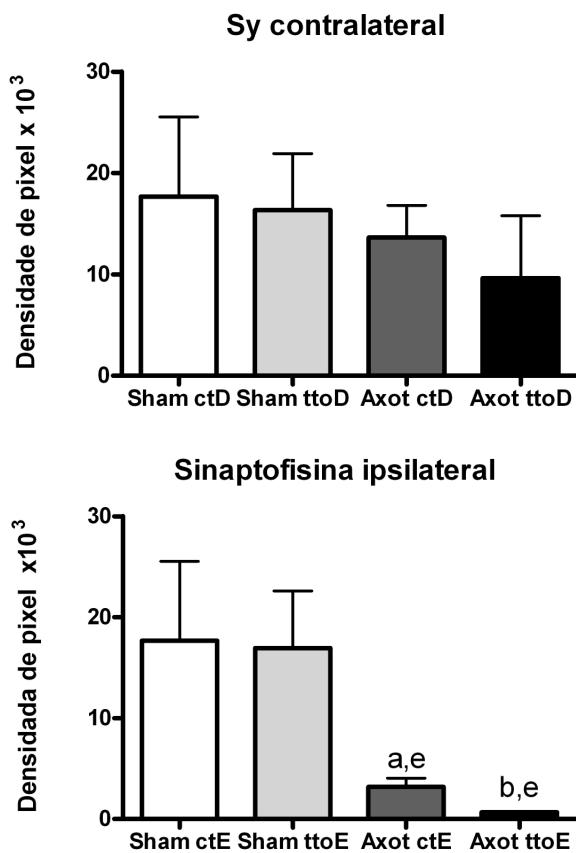


Figura 15: Gráfico da densidade de pixel para a imunomarcação anti-sinaptofisina no lado contralateral e ipsilateral de cada grupo no corno ventral da medula lombar. Testes *U* de Mann Whitney. [a-b] em relação a primeira barra, [e] em relação a segunda barra. **Lado contralateral:** nenhuma diferença estatística. **Lado ipsilateral:** [a] $p < 0,05$ vs sham ct; [b] $p < 0,01$ vs sham ct; [e] $p < 0,01$ vs sham tto.

4.4 Redução da imunomarcação para receptor Mas após tratamento com Ang-(1-7)

A Figura 16 mostra a imunorreatividade para receptor Mas no citoplasma dos neurônios motores e das células gliais circunjacentes. Os resultados demonstram que a expressão de Mas é modificada com a axotomia periférica, o que pode ser observado comparando os animais SHAM com o grupo axotomia controle (Figuras 16A e B com C e D, 17). Nesse caso a expressão de Mas foi especialmente observada no citoplasma neuronal e, em menor proporção, fora desses neurônios, porém próxima aos mesmos, mostrando provavelmente, também uma expressão glial desse receptor. Adicionalmente, existe uma pequena resposta contralateralmente à lesão (Figuras 16C e G, 18). Esse tipo de resposta é justificada pela existência de conexões entre os interneurônios que emitem seus axônios em direção ao lado contrário da medula, estabelecendo uma pequena via de sinapses que alcançam os motoneurônios do corno anterior, sendo essa via responsável por funções integrativas da medula (Lent, 2010).

Ainda, esta análise revela uma diferença de expressão de receptor Mas estatisticamente significativa entre os grupos axotomia controle e axotomia tratado (Figuras 17 e 18). O tratamento com Ang-(1-7) reduziu a expressão do seu próprio receptor após duas semanas da lesão.

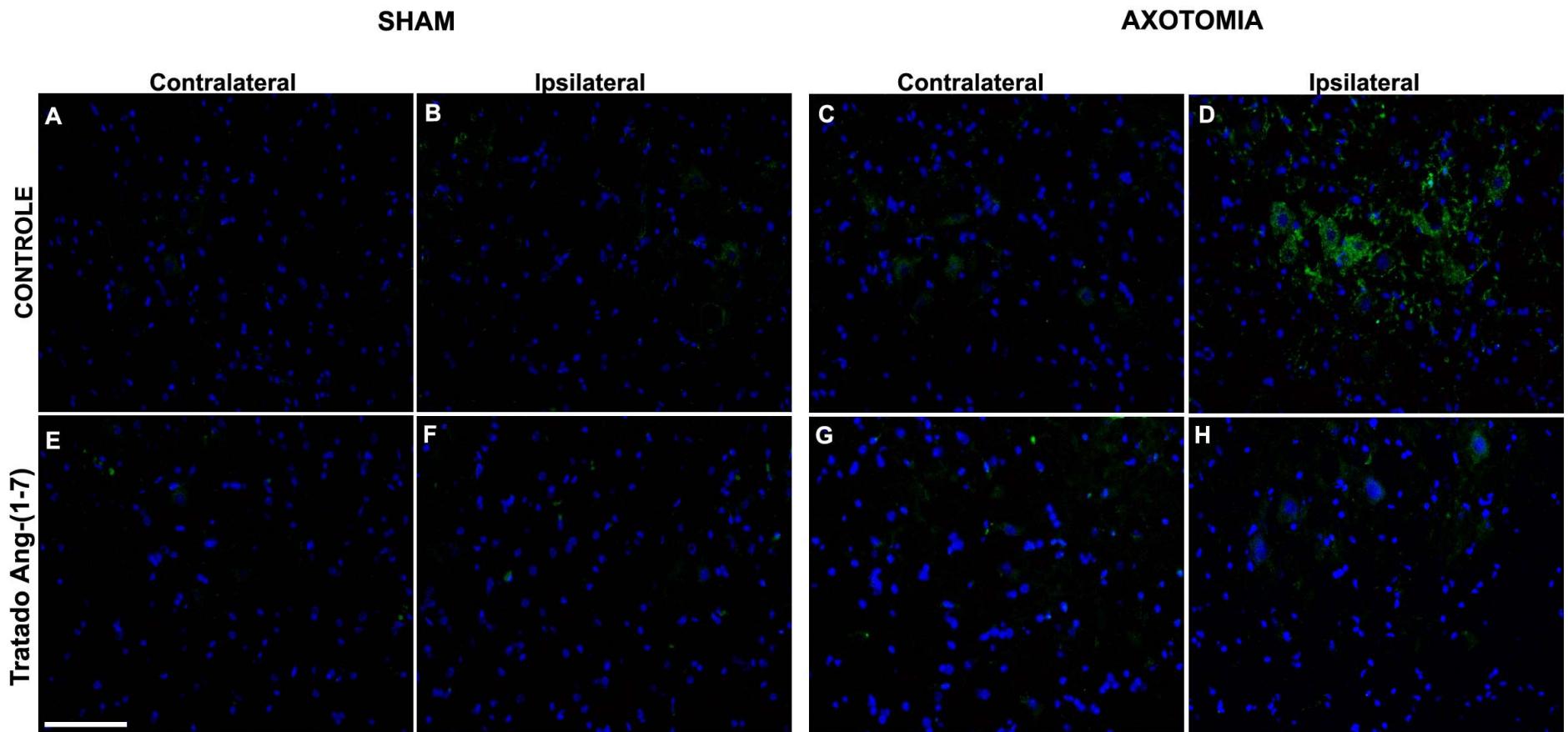


Figura 16: Imunomarcação anti-MAS em cortes transversais da medula lombar no núcleo motor lateral do corno ventral. **A-D** grupos controle, sham e axotomia. **E-H** grupos tratados com Ang-(1-7), sham e axotomia. Observe o aumento da expressão de receptor Mas no citoplasma dos neurônios motores do grupo controle axotomia, especialmente no lado ipsilateral em **D**. Escala = 100 μ m.

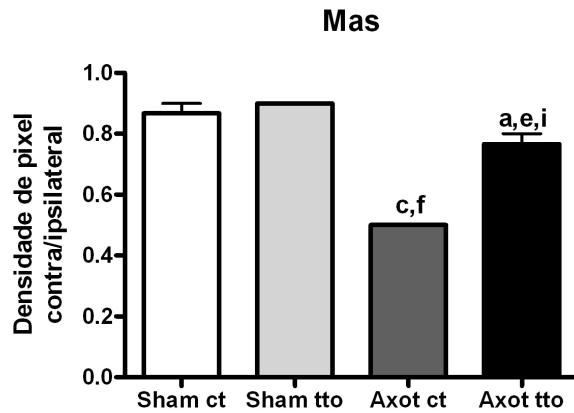


Figura 17: Gráfico da relação da densidade de pixel para a imunomarcação anti-MAS entre os lados contralateral e ipsilateral de cada grupo no corno ventral da medula lombar. ANOVA 1 critério e pós-teste Student-Newman-Keuls. [a-c] em relação a primeira barra, [e-f] em relação a segunda barra e [i] em relação a terceira barra. [a] $p < 0,05$ vs sham ct; [c] $p < 0,001$ vs sham ct; [f] $p < 0,001$ vs sham tto; [e] $p < 0,01$ vs sham tto; [i] $p < 0,001$ vs axot ct.

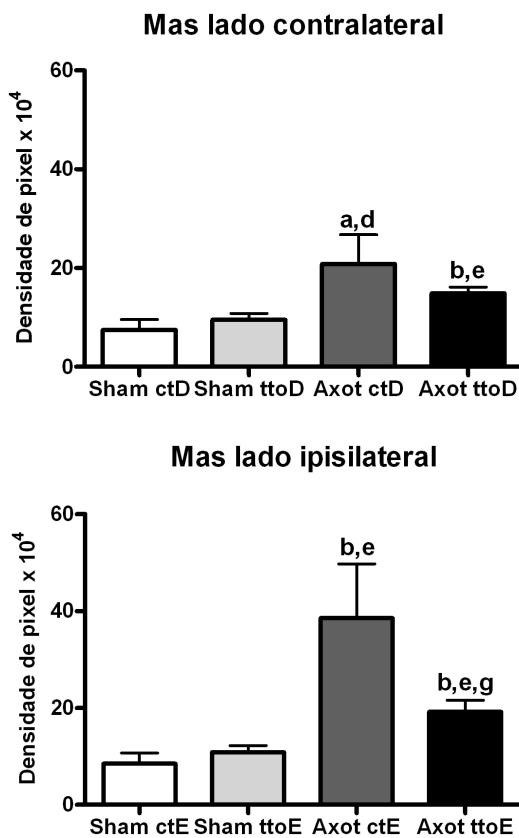


Figura 18: Gráfico da densidade de pixels para a imunomarcação anti-Mas no lado contralateral e ipsilateral de cada grupo no corno ventral da medula lombar. Testes *U* de Mann Whitney. [b] em relação a primeira barra, [e] em relação a segunda barra e [g] em relação a terceira barra. **Lado contralateral:** [a] $p < 0,05$ vs sham ct; [b] $p < 0,01$ vs sham ct; [d] $p < 0,05$ vs sham tto; [e] $p < 0,01$ vs sham tto. **Lado ipsilateral:** [b] $p < 0,01$ vs sham ct; [e] $p < 0,01$ vs sham tto; [g] $p < 0,05$ vs axot ct.

5. DISCUSSÃO

Dante de uma lesão nervosa periférica de um nervo espinal, respostas celulares e metabólicas são esperadas tanto no microambiente medular, onde se encontram corpos de neurônios e células gliais, quanto no foco da lesão, sobre o nervo isquiático, em que principalmente as células de Schwann são responsáveis pelo processo regenerativo axonal (Brosius e Barres, 2014). As células do tecido nervoso atuam em conjunto para orquestrar as respostas após lesão nervosa, e, diante disso, qualquer componente capaz de interferir nessas respostas pode conduzir ao sucesso ou insucesso do reparo tecidual e funcional do nervo comprometido.

Nesse sentido, nosso trabalho teve como objetivo analisar a influência da Ang-(1-7) após lesão do nervo isquiático.

Em nossos resultados observamos que, como esperado, após a axotomia do nervo isquiático, houve a perda da função dos músculos inervados pelo nervo comprometido que atuam durante a marcha e que, o tratamento com a Ang-(1-7) retardou o processo de recuperação entre o quinto e nono dias após a lesão. Após duas semanas do procedimento cirúrgico, através da análise de imunohistoquímica nos nervos dos animais submetidos à axotomia, observamos resultados que correspondem com axônios ainda degenerados nos nervos extraídos de animais tratados com Ang-(1-7), contribuindo com os achados do teste funcional.

Normalmente, na primeira semana após a lesão, ocorre, nos três primeiros dias, no coto proximal do nervo, a proliferação das células de Schwann, essas auxiliam os macrófagos na fagocitose de restos de mielina e, além disso, essas células se alinham ancoradas na lâmina basal formando as bandas de Büngner que, em torno do sétimo ao oitavo dia após a lesão, fornecem orientação e suporte para o crescimento axonal. Nesse momento, as células de Schwann reduzem seu número e atividade (Siqueira, 2007). Num segundo momento, os axônios começam a crescer em direção ao órgão-alvo estimulados por fatores de crescimento liberados pelas células de Schwann. A velocidade desse crescimento em roedores é em torno de 2 a 3 mm/dia (Siqueira, 2007).

Em nossos resultados, os nervos de animais controle apresentaram sinais de um processo regenerativo de quase completa conexão dos axônios lesados

juntamente com células de Schwann menos ativas quando comparadas com o grupo tratado. A menor expressão de S-100 beta observada nos animais controle indica que as células de Schwann já exerceram as funções de fagocitose, de produção de fatores neurotróficos e de orientação do crescimento axonal.

A grande marcação anti-S100 beta nos nervos de animais tratados com Ang-(1-7) aponta que as células de Schwann, mesmo após duas semanas da axotomia, mostraram-se bastante ativas e/ou em maior número (Figura 9). E como relatado anteriormente, espera-se essa maior atividade e proliferação na primeira semana após lesão, principalmente nas primeiras 48h (Spreca *et al.*, 1989; Sorci *et al.*, 2013). Além disso, observamos, através da imunomarcação anti-neurofilamento (Figura 8), axônios crescendo sem muita organização dentro dos envoltórios conjuntivos do nervo isquiático dos animais tratados com Ang-(1-7). Nesse contexto, podemos sugerir que o tratamento com Ang-(1-7) tenha influenciado a maior duração das respostas mais agudas das células de Schwann o que pode ter sido prejudicial para o crescimento axonal sequencial.

Em resposta à lesão do nervo isquiático, os corpos neuronais e a glia circunjacente também sofrem alterações, como o aumento da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que é um indicativo de que os astrócitos, o componente glial mais abundante, estão mais reativos (Aldskogius *et al.*, 1999). Após um estímulo lesivo, os astrócitos respondem de forma mais intensa entre 48-72h e, aparentemente, na maioria das situações, funciona como um neutralizador de reações de estresse agudo, restaurador homeostático do SNC e limitador de danos ao tecido (Aldskogius *et al.*, 1999).

Os astrócitos hipertrofiados mostram aumento de suas projeções citoplasmáticas que se direcionam para a membrana pós-sináptica do neurônio motor lesado se posicionando entre os terminais retraídos e a superfície do corpo neuronal (Oliveira *et al.*, 2004; Zanon e Oliveira, 2006, Spejo e Oliveira, 2014). Dessa maneira, normalmente, após axotomia, observamos o aumento da expressão de GFAP e a menor densidade de sinapses (sinaptofisina) em contato com o neurônio lesado (Emirandetti *et al.*, 2006). Nossos resultados para o grupo axotomizado controle estão de acordo com esse comportamento inversamente proporcional entre sinaptofisina e GFAP. Em contrapartida, nos

animais axotomizados e tratados com Ang-(1-7), após duas semanas da lesão, foi identificada diminuição significativa na expressão da proteína sinaptofisina, resultando em uma menor cobertura sináptica, juntamente com uma redução da expressão de GFAP.

Nos animais tratados com Ang-(1-7) observamos menor regeneração periférica, menor densidade de sinapses e menos GFAP ao redor dos neurônios medulares. Segundo Berg *et al.* (2013) a deficiência em GFAP atrasa a regeneração axonal e está relacionada com um menor contato sináptico no corpo neuronal. A menor reatividade dos astrócitos, identificada pela menor expressão de GFAP, pode comprometer o crescimento axonal e até mesmo a sobrevivência neuronal. Pois, são células fonte de fatores de crescimento, também denominados neurotrofinas, que são proteínas sinalizadoras endógenas que promovem sobrevivência e estimulam populações específicas de neurônios. Os astrócitos reativos têm ampla capacidade de produzir e liberar variadas quantidades desses fatores que, por sua vez, resgatam neurônios da apoptose e morte após axotomia (Yan *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994), promovem brotamento e elongação axonal após lesão nervosa periférica e durante o desenvolvimento (Mendell *et al.*, 2001).

A redução da expressão do receptor Mas nos animais axotomizados e tratados com Ang-(1-7) nos levou a questionar se as alterações observadas tanto no nervo como na medula espinal seriam decorrentes da ativação ou da inibição do eixo Ang-(1-7)/Mas. A literatura mostra a possibilidade de haver menor responsividade do receptor Mas com altas doses de Ang-(1-7) (Muthalif *et al.*, 1997; Gironacci *et al.* 2002; 2011). Gironacci *et al.* (2011) mostraram que a Ang-(1-7) induz a internalização do receptor Mas por endocitose via clatrina dependente. Esses autores também mostram que a resposta do receptor Mas é dose-dependente, sendo que a partir da dose de 100nM, os efeitos esperados da Ang-(1-7) começam a diminuir. Portanto, a Ang-(1-7) modula seu receptor em diferentes concentrações.

Esses resultados corroboram nossos achados uma vez que, utilizamos a mesma dose de 100nM e observamos, através da técnica de imunohistoquímica anti-Mas (Figura 16) que, após lesão do nervo e tratamento com Ang-(1-7) houve uma redução significativa dos receptores Mas. Cabe

destacar que, o aumento da expressão do receptor Mas nos animais axotomizados controles, principalmente nos neurônios no núcleo motor lateral que compõem o nervo isquiático, indica que esse receptor e seu ligante desempenha algum papel nas respostas metabólicas e celulares após lesão nervosa periférica. Essa idéia ganha força quando olhamos para as modificações ocorridas com o tratamento de Ang-(1-7). O tratamento interfere nas respostas gliais e na plasticidade sináptica e, sabemos que, o conjunto dessas respostas é fundamental para o processo regenerativo sequencial.

Apesar dos efeitos observados em nosso trabalho, a escassa literatura a respeito dos efeitos da Ang-(1-7) no Sistema Nervoso, aponta sempre para um efeito pró-regenerativo para a Ang-(1-7). As ações da Ang-(1-7) sobre a resposta astrogial frente à lesão periférica podem estar associadas à ativação do seu receptor Mas, o qual, uma vez ativado, altera a expressão de óxido nítrico (NO) (Patel e Schultz, 2013). É sabido que o NO tem diversos efeitos no SNC, sendo considerado um neuromodulador (Bach, 1996). Os autores que investigam o papel do NO no tecido nervoso não apresentam um consenso sobre a sua função. Uns mostram que a molécula apresenta efeitos neuroprotetores, com envolvimento na regeneração e na atividade anti-apoptótica (Zochodne *et al.*, 1999; Cristino *et al.*, 2000), outros, demonstram o papel do NO na degeneração (Dawson e Dawson, 1996; Bal-Price e Brown., 2001) porém, estes últimos, relatam que a neurotoxicidade está relacionada a uma produção patológica de NO no tecido nervoso (Contestabile *et al.*, 2012)

O próprio estímulo lesivo nos axônios aumenta a expressão de NO no nervo e na medula espinal (Emirandetti *et al.*, 2010) e a inibição de uma das enzimas que sintetiza NO, a iNOS, acarreta a redução da astrogliose juntamente com redução da densidade sináptica na medula após 14 dias da lesão (Emirandetti *et al.*, 2010), semelhante ao observado em nosso estudo. Além disso, após lesão periférica, a maior atividade da iNOS no nervo ocorre por volta do 14º dia (Ding *et al.*, 1997; Zochodne *et al.*, 1999) e a redução da atividade dessa enzima, pelo uso de inibidores, pode comprometer o processo regenerativo por atrasar a degeneração axonal retrógrada (Koeberle e Ball, 1999).

Além da ação sobre o NO, a Ang-(1-7) pode modular outras substâncias relacionadas com a inflamação, como o TNF-alfa, que, por sua vez, podem influenciar o processo de degeneração e regeneração axonal. Silveira *et al.* (2010) mostraram a redução de TNF-alfa em modelo de artrite reumatoide após o tratamento com Ang-(1-7). Essa citocina, juntamente com outros componentes inflamatórios, estão presentes após lesão nervosa periférica e promovem o processo inflamatório inicial envolvido com a degeneração Walleriana e, posteriormente, regulam o processo regenerativo sequencial (Câmara-Lemarroy *et al.*, 2010). Animais *knockouts* para TNF-alfa apresentaram importante preservação de axônios após indução de degeneração Walleriana (Siebert e Brück, 2003).

Dessa forma, baseando-se nos trabalhos já citados e nas ações conhecidas do peptídeo nos processos inflamatório e regenerativo (Mori *et al.*, 2014; Acuña *et al.*, 2014) podemos observar que os efeitos da Ang-(1-7) podem variar de acordo com o tratamento e o modelo. Sendo assim, uma vez que os animais controle axotomizados expressam mais receptores Mas quando comparados aos não axotomizados e aos tratados com Ang-(1-7), podemos inferir que esse peptídeo, desempenha algum papel modulador no processo de regeneração axonal. Com nossos resultados não podemos dizer se esses efeitos são positivos ou negativos, uma vez que, a dose que utilizamos identificou o processo e ainda que, nessa dose, já foi demonstrado pela literatura que a Ang-(1-7) promove *downregulation* em seu receptor, assim como observado em nosso trabalho. É possível que uma dose menor desse peptídeo, ou ainda, o tratamento agudo, possa nos esclarecer melhor os possíveis mecanismos envolvidos na resposta à Ang-(1-7) após lesão axonal.

Diante dos nossos resultados e à pergunta que eles nos trouxeram, novos experimentos podem ser pensados. Primeiramente, o que parece muito necessário, é realizarmos a cinética da expressão do receptor Mas, a fim de identificarmos o ponto em que começa a redução de sua expressão e, dessa forma, poderíamos observar se a Ang-(1-7) teria mais efeito numa fase mais precoce relacionada com respostas agudas após lesão nervosa. Ainda, pode-se pensar na redução da dose ou ainda, a utilização do antagonista do receptor Mas, enfim, são muitos os caminhos que podemos seguir daqui para diante

para respondermos qual o papel do eixo Ang-(1-7)/Mas no tecido nervoso danificado, contudo o que devemos ressaltar desse primeiro passo, é que o dano axonal promove uma alteração do receptor Mas, o qual nos mostra um possível papel desse receptor e seu ligante (Ang-(1-7)) no reparo axonal uma vez que o tratamento com Ang-(1-7) é capaz de influenciar as respostas do tecido nervoso que buscam a regeneração do segmento comprometido.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostram novas evidências que apontam que o heptapeptídio Ang-(1-7) e seu receptor Mas estão envolvidos nas respostas do tecido nervoso após lesão axonal periférica. Nesse sentido, conclui-se que:

- 1- Nervos de animais tratados com Ang-(1-7) após a axotomia apresenta recuperação funcional mais lenta entre os dias cinco e nove pós-lesão.
- 2- Ainda nos nervos de animais tratados com Ang-(1-7) após a axotomia, as células de Schwann estão mais ativas duas semanas após a lesão quando, normalmente, já teriam diminuído sua reatividade. E, os axônios crescem de forma menos organizada comparativamente aos animais controles.
- 3- O tratamento com Ang-(1-7) reduz a astrogliose e a cobertura sináptica em relação aos corpos neuronais do núcleo lateral do corno ventral da medula espinal lombar após axotomia periférica.
- 4- O dano nos axônios dos neurônios motores promove expressão de receptor Mas no citoplasma do neurônio motor e células gliais adjacentes.
- 5- O tratamento com Ang-(1-7) durante 14 dias na dose de 100nM é capaz modular a expressão de seu próprio receptor Mas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, N.J.; RÖNNBÄCK,L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* v.1, p. 41-53. 2006.
2. ACUÑA, M.J.; PESSINA, P.; OLGUIN, H.; CABRERA, D.; V.I.O.; CP.; BADER, M.; *et al* Restoration of muscle strength in dystrophic muscle angiotensin-1-7 by inhibiting TGF- β signaling, v.5, p. 1237-1249, 2014.
3. AGUADO, L.I. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech.* v. 6, p. 462-73, 2002.
4. ALBRECHT, J.; STEINBORN, B.; ZAROWSKI, M. Cytokines, epilepsy and antiepileptic drugs – is there a mutual influence. *Pharmacol Rep*, v. 59, p. 129-138, 2007.
5. ALDSKOGIUS, H.; SVENSSON, M. Neuronal and glial responses to axon injury. In: MALHOTRA, S.K.(ed.) *Advances in structural biology*, JAI Press, Greenwith, v. 2, p. 191-223, 1993.
6. ALDSKOGIUS, H.; LIU, L; SVENSSON, M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J. Neurosci.Res.*, v.58, p.33-41, 1999.
7. AMBÜHL, P.; FELIX, D.; IMBODEN, H.; KHOSLA MC, FERRARIO C.M. Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurons. *Regul. Pept*, v. 38, p. 111-20, 1992.
8. AVERILL DB, DIZ DI. Angiotensin peptides and the baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res. Bull.* v. 51, p. 119-128, 2000.
9. BAL-PRICE, A.; BROWN, GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci*, v. 21, p. 6480–6491, 2001.
10. BACH, K.B., MITCHELL, G.S., 1996. Hypoxia induced long term facilitation of respiratory nerve activity is serotonin dependent. *Respir. Physiol*, v.104, p. 251–260. 1996.

11. BARRON, KD. Comparative observations on the cytologic reaction of central and peripheral nerve cells to axotomy. *Spinal Cord Reconstruction*, p. 7-40, 1998.
12. BERG, A.; ZELANO, J.; PEKNA, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNY, M.; CULLHEIM, S. Axonal regeneration after sciatic nerve lesion is delayed but complete in GFAP- and vimentin-deficient mice, v. 8, p. 79395, 2013.
13. BEZZI, P.; CARMIGNOTO, G.; PASTI, L.; VESCE, S.; ROSSI, D.; RIZZINI, BL.; POZZAN, T.; VOLTERRA, A. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, v. 391, p. 281-5, 1998.
14. BLOCK, CH.; SANTOS, RA.; BROSNIHAN, KB.; FERRARIO, CM. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides*, v. 9, p.1395-401, 1988.
15. BROSIUS, A.; LUTZ A.; BARRES, BA. Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. *Dev Cell*. v. 28, p. 7-17, 2014.
16. BRUSHART, T.M. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *Journal Neuroscience*, v. 13, p. 2730-2738. 1993.
17. BRUIJN, LI.; MILLER, TM.; CLEVELAND, DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS, v. 27, p. 723-49, 2004.
18. BURNETT, M.G.; ZAGER, E.L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical Focus*, v. 16, n. 5, p. 1-7. 2004.
19. CALKA J, BLOCK CH. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide synthase in the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Brain Res Bull*. v. 30, p.677-85, 1993.
20. CAMARA-LEMARROY, C.R.; GUZMAN-DE LA GARZA, F.J.; FERNANDEZ-GARZA, N.E. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuro Immuno Modulation*, vol. 17, p. 314–324, 2010.

21. CAREY, R.M. Angiotensin type-2 receptors and cardiovascular function: are angiotensin type-2 receptors protective Curr. Opin. Cardiol, v. 20, p. 264-9, 2005.
22. CHEN, D.H. Qualitative and quantitative study of synaptic displacement in chromatolyzed spinal motoneurons of the cat. J. Comp. Neurol, v.177, p.635-664, 1978.
23. CRISTINO, L.; PICA, A.; DELLA CORTE F, BENTIVOGLIO M. Plastic changes and nitric oxide synthase induction in neurons that innervate theregenerated tail of the lizard Gekko gecko. I. Response of spinal motoneurons to tail amputation and regeneration. J Comp Neurol, v. 417, p. 60–72, 2000.
24. CONRADI, S. Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the motoneuron surface in the lumbosacral spinal cord of the adult cat. Acta Physiol. Scand. Suppl, v.332, p.5-48, 1969.
25. CONTESTABILE, A.; MONTI, B.; AND POLAZZI, E. Neuronal-glial Interactions Define the Role of Nitric Oxide in Neural. *Current Neuropharmacology*, v.10, p. 303-310, 2012.
26. COSTA, A.; *et al.* Angiotensin-(1-7) induces peripheral antinociception through mas receptor activation in an opioid-independent pathway. Pharmacology. v. 89, p. 137-44, 2012.
27. DAMPNEY RAL. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. Physiol. Rev. v.74, p. 323-364, 1994.
28. DAWSON, VL.; DAWSON, TM. Nitric oxide neurotoxicity. J Chem Neuroanat, v. 10, p.179-90, 1996.
29. DEITMER, JW.; ROSE, CR. Ion changes and signalling in perisynaptic glia. Brain Res Rev, v. 63, p. 113–129, 2010.
30. DING, M.; BA, ST, JF.; PARKINSON, P.; MED BERRY, JL.; WONG, NE.; ROGERS, LJ.; IGNARRO, JE. Merrill Inducible nitric-oxide synthase and

- nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia: A kinetic analysis J. Biol. Chem, v. 272, p. 11327–11335, 1997.
31. DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSELIN, M.; STAGLIANO, N.; *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin-(1-9). Circ. Res, v. 87, p. 523-525, 2000.
32. EMIRANDETTI, A.; ZANON, R.; SABHA, M; OLIVEIRA, ALR. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. Brain Research, v. 1095, p. 35-42, 2006.
33. FAWCETT, J.W.; KEYNES, R.J. Peripheral nerve regeneration. Annual Review of Neuroscience, v. 13, p. 43-0. 1990.
34. FERGUSON, CJ.; LENK, GM.; JONES, JM.; GRANT, AE.; WINTERS, JJ; DOWLING, JJ; GIGER, RJ; *et al.* Hum Mol Genet. Neuronal expression of Fig4 is both necessary and sufficient to prevent spongiform neurodegeneration, v. 21, p. 3525-34, 2012.
35. FERRARIO, C.M.; JESSUP, J.; GALLAGHER, P.E.; AVERILL, D.B.; BROSNIHAN, K.B.; ANN TALLANT, E.; SMITH, R.D.; CHAPPELL, M.C. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. Kidney Int, v.68, p. 2189-2196, 2005.
36. SANTOS, RA.; SIMOES, ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme-2 angiotensin-(1-7)-Mas axis. Exp Physiol, v. 93, p. 519-27, 2008.
37. FRIED, K. *et al.* Ultrastructure of afferent axon endings in neuroma. Journal of Neurocytology, v. 20, p. 682-701. 1991.
38. FROSTICK, S.P.; YIN, Q.; KEMP, G.J. Schwann cells, neurotrophic factors and peripheral nerve regeneration. Microsurgery. v. 18, p. 397-405. 1998.
39. FU S.Y.; GORDON, T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. Molecular Neurobiology, v. 14, p. 67–116. 1997.

40. GIRONACCI, MM.; FERNANDEZ-TOME, MC.; SPEZIALE, E.; STERIN-SPEZIALE, N. PENÃ C. Angiotensin-(1-7) enhances phosphatidylcholine biosynthesis in the rat renal cortex. *Biochel Pharm*, v. 63, p. 507–514, 2011.
41. GORDON, T.; BOYD, S.O. Experimental strategies to promote functional recover after peripheral nerve injuries. *Journal of the Peripheral Nervous System*, v. 8, p. 236-250. 2003.
42. GRAEBER, M.B.; KREUTZBERG, G.W. Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. *J. Neurocytol.*, v.15, p.363-373, 2004.
43. GREENE, L.J.; SPADARO, A.C.; MARTINS, A.R.; PERUSSI DE JESUS, W.D.; CAMARGO, A.C. (1982) Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension*, v. 4, p. 178-84, 1982.
44. GONZÁLEZ, F.; MORENO, L.; Retrograde response in axotomized motoneurons: nitric oxide as a key player in triggering reversion toward a dedifferentiated phenotype. *Neuroscience*. 2014 Dec 26;283:138-65. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.021. Epub 2014 Aug 27.
45. GUO, F; LIU, B; TANG, F; LANE, S; EKATERINA, A; et al. Astroglia are a possible cellular substrate of angiotensin(1-7) effects in the rostral ventrolateral medulla, v. 87, p. 578–584, 2010.
46. HELLNER K, WALTHER T, SCHUBERT M, ALBRECHT D. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci*, v. 29, p. 427- 435, 2005.
47. HERMANSSON, S.; KIDMAN, K.; SVEGMARK, S. A phaseseparated biopolymer mixture. *Biopolymer mixtures University Press*, Nottingham, p. 225–246, 1995.
48. HOLY, Z.; BRASZKO, JJ.; KUPRYSZEWSKI, G.; WITCZUK, B., WISNIEWSKI, K. Angiotensin I1 - derived peptides devoid of phenylalanine

- in position 8 have full psychotropic activity of the parent hormone. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 43, p. 183-192, 1992.
49. INSERRA, MM.; BLOCH, DA.; TERRIS, DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery*, v. 18, p.119-124, 1998.
50. JESSEN, K.R.; MIRSKY, R. Negative Regulation of Myelination: Relevance for Development, Injury, and Demyelinating Disease. *Glia*, v. 56, p. 1552-1565, 2008.
51. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of neural science. 4.ed. McGraw-Hill, p. 45-55, 2000.
52. KANG, J.; JIANG, L.; GOLDMAN, SA.; NEDERGAARD, M. Astrocytemediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*, v.1, p. 683–692, 1998.
53. KOEBERLE. PD.; BALL, AK.; Nitric oxide synthase inhibition delays axonal degeneration and promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Exp Neurol*. v. 158, p. 366-81, 1999.
54. KOLIATSOS, VE.; CAYOUETTE, MH.; BERKEMEIER, LR.; RE, C.; PRICE, DL. Rosenthal A Neurotrophin 4/5 is a trophic factor for mammalian facial motor neurons. *Proc Nat Acad Sci USA*, v.91, p. 3304–3308,1994.
55. KOYAMA, Y.; BABA, A. Endothelin-induced protein tyrosine phosphorilation of cultured astrocytes: its relationship to cytosqueletal actin organization. *Glia*, v.26, p.324-332, 1999.
56. LENT, ROBERTO. Cem Bilhões de Neurônios. Conceitos fundamentais de neurociência. Atheneu, 2^a edição, São Paulo, 2010.
57. LI, YX.; RINZEL, J.; KEIZER, J.; STOJILKOVIĆ, SS. Calcium oscillations in pituitary gonadotrophs: comparison of experiment and theory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 91, p. 58-62, 1994.

58. LIEBERMAN, A.R. The axon reaction: a review of the principal features of the perikaryal responses to axoninjury. *Int. Rev. Neurobiol.*, v.14, p.49-124, 1971.
59. LINDA, H.; PIEHL, F.; DAGERLIND, A.; VERGE, VMK.; ARVIDSSON, U.; CULLHEIM, S.; RISLING, M.; ULFHAKE, B.; HOKFELT, T. Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with special reference to motoneurons, v. 91, p. 284-295, 1992.
60. LUNDBORG, G. Nerve injury and repair. Regeneration, reconstruction and cortical remodelling, 2nd ed. Elsevier, Philadelphia, 2004.
61. LU, Z.; *et al.* Deletion of the major peroxiredoxin Tsa1 alters telomere length homeostasis. *Aging Cell*, v.12, p. 635-44, 2013.
62. MACCUMBER, MW.; ROSS, CA.; SNYDER, SH. Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v 6, p. 2359-63, 1990.
63. MECCA, AP.; REGENHARDT ,RW.; O'CONNOR TE, JOSEPH JP, RAIZADA MK, KATOVICH MJ, *et al.* Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischemic stroke. *Exp Physiol*, v. 96, p.1084–1096, 2011.
64. MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia funcional. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
65. MCCALL, M. A.; GREGG, R. G.; BEHRINGER, R. R.; BRENNER, M.; DELANEY, C. L.; GALBREATH, E. J.Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 6361-6366, 1996.
66. MECCA, A.P.; REGENHARDT, R.W.; O'CONNOR, TE.; JOSEPH, JP.; RAIZADA, MK.; KATOVICH, MJ. *et al.* Cerebroprotection by angiotensin-(1-

- 7) in endothelin-1-induced ischemic stroke. *Exp Physiol*, v. 96, p. 1084-1096, 2011.
67. MEDINACELI, D.L.; DERENZO, E.; WYATT, R.J. Rat sciatic funcional index data management system with digitized input. *Comp Biom Res*. v.17, p.185-92, 1984.
68. MENDELL, LM.; MUNSON, JB.; ARVANIAN, VL. Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. *J Physiol*, v. 533, p. 91-7, 2001.
69. MORAN, L.B.; GRAEBER, M.B. The facial nerve axotomy model. *Brain Res. Rev.*, v.44, p.154-178, 2004.
70. MORI, J.; PATEL, V.B.; ABO ALROB, O.; BASU, R.; ALTAMIMI, T.; DESAULNIERS, J.; *et al.* Angiotensin 1-7 improves diabetic cardiomyopathy, diastolic dysfunction in db / db mice, reducing inflammation and lipotoxicity, v. 306, p. 812-212014.
71. MUTHALIF, M.M.; BENTER, I.F.; UDDIN, M.R.; HARPER, J.L.; MALIK, K.U. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *JPET*, v. 284, p. 388 –398, 1997.
72. NORTON, W.T. Cell reactions following acute brain injury: a review. *Neurochem Res*, v. 24, p. 213–218, 1999.
73. OLIVEIRA, A.L.R.; THAMS, S.; LIDMAN, O.; PIEHL, F.; HÖKFELT, T.; KÄRRE, K.; LINDA.; *et al.* A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.101, p.17843-17848, 2004.
74. PATEL, K.P.; SCHULTZ, H.D. Angiotensin peptides and nitric oxide in cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal*, v. 19, p. 1121-32, 2013.

75. PAN, C.H. Wen, and C.S. Lin, Interplay of angiotensin II and angiotensin(1-7) in the regulation of matrix metalloproteinases of human cardiocytes. *Exp Physiol*, v. 93, p. 599-612, 2008.
76. PEACH, M.J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* v. 57, p. 313-70, 1977.
77. PEKNY, M. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin Knock-out mice. *Porg.Brain Res.*, v.132, p.23-30, 2001.
78. PEKNY, M.; PEKNA. M.; Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev.* v. 94, p. 1077-98, 2014.
79. PEREA G, ARAQUE A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci*, v. 25, p. 2192–2203, 2005.
80. PEREIRA, R.M.; SANTOS, R.A.S.; TEIXEIRA, MM. *et al.* The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: Evidence for a protective role of angiotensin-(1–7) *J Hepatol*, v. 46, p. 674–81, 2007.
81. PIEHL, F.; ARVIDSSON, U.; JOHNSON, H.; CULLHEIM, S.; DAGERLIND, A.; ULFHAKE, B.; CAO,Y.; ELDE, R.; PETTERSSON, R.F.; TERENIUS, L. GAP-43, aFGF, CCK and alpha- and beta-CGRP in rat spinal motoneurons subjected to axotomy and/or dorsal root severance. *Eur. J. Neurosci.*, v.5, p.1321-1333,1993.
82. PIEHL, F.; J.I., R.R.; CULLHEIM, S.; HOKFELT, T.; LINDHOLM, D.; HUGHES, R.A. Fibroblast growth factors regulate calcitonin gene-related peptide mRNA expression in rat motoneurons after lesion and in culture. *Eur J Neurosci*, v. 7, p. 1739–1750, 1995.
83. PIEHL, F.; HAMMARBERG, H.; TABAR, G.; HÖKFELT, T.; AND CULLHEIM, S. Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat

- motoneurons depends on age and type of injury. *Exp. Brain Res.*, v. 119, p. 191–204, 1998.
84. POPRATILOFF, A.; KHARAZIA, V.N.; WEINBERG, R.J.; LAONIPON, B.; RUSTIONI, A. Glutamate receptors in spinal motoneurons after sciatic nerve transection. *Neuroscience*, v. 4, p. 953-8, 1996.
85. REGENHARDT, R.W.; MECCA, A.P.; DESLAND, F.; RITUCCI-CHINNI, P.F.; LUDIN, J.A.; *et al.* Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol*, v. 99, p. 442-53. 2013.
86. REISERT, I.; WILDEMANN, G.; GARB, D.; PILGRIM, C. The glial reaction in the course of axon regeneration: a stereological study of the rat hypoglossal nucleus. *J. Comp. Neurol.*, v.229, p.121-128, 1984.
87. RISLING, M.; CULLHEIM, S.; HILDEBRAND, C. Reinnervation of the ventral root L7 from ventral horn neurons following intramedullary axotomy in adult cats. *Brain Res*, v. 280, p.15-23, 1983.
88. ROGERS, S J.; HEPBURN, S.; AND WEHNER, E. Parent reports of sensory symptoms in toddlers with autism and those with other developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.*, v. 33, p. 631–642, 2003.
89. RODRÍGUEZ, F.J.; VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug Discovery Today: Disease Models*, v. 1, n. 2, p.177-85. 2004.
90. ROHLMANN, A.; LASKAWI, R.; HOFER, A.; DERMIETZEL, R.; WOLFF, J.R. Astrocytes as rapidsensors of peripheral axotomy in the facial nucleus in rats. *Neuroreport*, v. 5, p. 409-412, 1994.
91. ROSE, C.R.; RANSOM, B.R. Intracellular sodium homeostasis in rat hippocampal astrocytes. *J Physiol.* v. 491, p. 291-305, 2010.
92. SANTOS R.A.S, BROSNIHAN K.B, CHAPPELL M.C, PESQUERO J.L, CHERNICKY CL, GREENE LJ, FERRARIO CM. Converting enzyme activity

- and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, v. 11, p. 153-157, 1988.
93. SANTOS R.A.S., CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., ANDRADE S.P. Angiotensin-(1-7): an update, *Regul.Pept*, v. 9, p. 45-62, 2000.
94. SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J.; SIMOES, ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp. Physiol*, v. 93, p. 519-527, 2008.
95. SANTOS, R.A.S.; SILVA, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.; MACHADO, R.P.; DE BUHR I *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.100, p. 8258-63, 2003.
96. SASAKI, H.; HUI, C.; NAKAFUKU, M.; KONDOH, H; A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. v. 124, p. 1313-22, 1997.
97. SCHIAVONE, A.; SAGRADA, A.; MICHELETTI, R.; GIACHETTI, A. Pharmacological characterization of muscarinic receptors involved in McN-A-343-induced effects on intestinal motility and heart rate in conscious dogs. *Br. J. Pharmacol*, v. 94, p. 566–572, 1988.
98. SILVA, A.Q.; SANTOS, R.A.; FONTES, M.A. Blockade of endogenous angiotensin-(1-7) in the hypothalamic paraventricular nucleus reduces renal sympathetic tone. *Hypertension*, v. 46, p. 341–348, 2005.
99. SIQUEIRA, R. Peripheral Nerve Injury: A Review, v. 15, p. 226-233, 2007.
100. SILVEIRA, K.D.; *et al.* Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J Immunol*, v. 185, p. 5569-76, 2010.
101. SPRECA, A.; RAMBOTTI, M.G.; RENDE, M.; SACCARDI, C.; AISA, M.C.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. Immunocytochemical localization of S-100b

- protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. *J Histochem Cytochem*, v. 37, p. 441-6, 1989.
- 102.SPEJO A, B.; CARVALHO J, L.; GOES A, M.; OLIVEIRA A, L. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells on spinal motoneurons following ventral root axotomy: synapse stability and axonal regeneration. *Neuroscience*, v. 250, p. 715-32, 2013.
- 103.SCHIAVONE, M.T.; SANTOS, R.A.; BROSNIHAN, K.B.; KHOSLA, M.C.; FERRARIO, C.M. (1988) Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 4095-4098, 1988.
- 104.SIEBERT, H.; BRUCK, W. The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after peripheral nerve axotomy: a study in different knockout mice. *Brain res*, v. 960, p. 152-156, 2003.
- 105.SORCI, G.; RIUZZI, F.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. Rage in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta*, v.1833, p.101-9, 2013.
- 106.SHRIKANT, P.; BENVENISTE, E.N. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol*, v. 157, p.1819-22, 1996.
- 107.SVENSSON, M.; LIU, L.; MATTSSON, P.; MORGAN, B.P.; ALDSKOGIUS, H. Evidence for activation of the terminal pathway of complement and upregulation of sulfated glycoprotein (SGP)-2 in the hypoglossal nucleus following peripheral nerve injury. *Mol. Chem. Neuropathol.*, v.24, p.53-68, 1995.
- 108.TALLAND, E.A.; DIZ, E.I.; FERRARIO, C.M. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension*, v. 34, p. 950-957, 1999.

- 109.TALLANT, E.A.; FERRARIO, C.M.; GALLAGHER, P.E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol*, v. 289, p. 1560–6, 2005.
- 110.TETZLAFF, W.; GRAEBER, M.B.; BISBY, M.A.; KREUTZBERG, G.W. Increased glial fibrillary acidic protein synthesis in astrocytes during retrograde reaction of the rat facial nucleus. *Glia*, v.1, p.90-95, 1988.
- 111.THEODOSIS, D.T.; TRAILIN, A.; POULAIN, D.A. Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*, v. 290, p.1175-1182, 2006.
- 112.VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the *Nat Rev Neurosci*. v. 8, p. 626-40, 2005.
- 113.XIN, L.; RICHARDISON, P.M.; GERVAIS, F.; SKAMENE, E. A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brain Res*, v. 510, p. 144-146, 1990.
- 114.YAN, Q.; MILLER, J.A. The use of trophic factors in degenerative motoneuron diseases. *Exp Neurol*, v.124, p. 60-3, 1993.
- 115.ZANON, R.; OLIVEIRA, A. L. R. MHC I upregulation influences the astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transaction. *Experimental Neurolog*, v. 200, p. 521-531, 2006.
- 116.ZOCHODNE, D.W.; LEVY, D.; ZWIERS, D.; SUS, H; RUBIN, I.; CHENG, C.; LAURIZITEN, M.; Evidence for nitric oxide and nitric oxide synthase activity in proximal stumps of transected peripheral nerves. *Neurosci*, v. 91, p. 1515–1527, 1999.

ANEXO 1



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 109/12, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Plasticidade sináptica e na reatividade das células da glia após lesão do nervo ciático em camungongos submetidos ao tratamento crônico com angiotensina 1-7", sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **05 de Abril de 2013**.

(We certify that the protocol nº 109/12, about "Synaptic plasticity and reactivity of glial cells after sciatic nerve injury in camungongos subjected to chronic treatment with angiotensin 1-7", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 05/04/2013)

Uberlândia, 09 de Abril de 2013.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA - Comissão de Ética na
Utilização de Animais - Portaria R.Nº. 2014/2012