

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

THIAGO LUIZ DO NASCIMENTO LAZARONI

MODULAÇÃO DA MEMÓRIA PELO EIXO
ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS

Belo Horizonte

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

THIAGO LUIZ DO NASCIMENTO LAZARONI

MODULAÇÃO DA MEMÓRIA PELO EIXO ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Grace Schenatto
Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Robson A. Souza
dos Santos

Belo Horizonte

2009

AGRADECIMENTOS

Ao povo brasileiro, que sempre lutou e derramou suor para que tão poucos quantos eu pudesse ter educação pública, gratuita e de qualidade.

Ao meu avô, que talvez não entenda o que significa este título para mim, mas foi a pessoa que sempre brigou com todos para eu nunca parasse de estudar e pudesse sonhar com um futuro diferente. Vovô, pai, amigo. Eu amo você!

À Zila, que foi muito mais que uma mãe, foi a base para toda minha vida. Ensinou-me simplicidade, humildade, alegria. Acolheu-me como filho “branco” e me amou sem nunca ter dito isso. Saudades eternas.

Ao Guma, que foi meu professor e depois se tornou meu amigo e de amigo virou irmão e por tantas vezes pai. E um dos poucos que acreditou no meu potencial e me incentivou a não desistir e lutar pelos meus ideais. Guma, é difícil acreditar que pessoas como você existem. Obrigado por tudo.

À Grace, que me acolheu quando muitos me rejeitaram, que acreditou em mim e me ensinou tantas coisas que vão além do trabalho científico. Que me deu um abraço quando eu estava triste, que me fez rir com suas histórias e que eu admiro pelos seus exemplos.

À minha mãe, o maior exemplo de trabalho na minha vida. Mulher lutadora, simples e sem ambições. Mulher que abriu mão de coisas importantes para que eu tivesse oportunidades. Mãe, hoje sei reconhecer sua luta. Obrigado.

Ao Everson e à Malu, amigos nessa minha jornada. Que me aconselham e me fizeram ser uma pessoa melhor nos últimos anos.

À Wal, pelo pontapé inicial neste projeto.

À família NNC, que me faz crescer como pessoa, me ofertando amizades e desafios. Em especial à Mariana, à Isa e à Cris, que juntos começamos essa caminhada. À Ana, Hércules, Daniel, Luciana e Flávio, pelo bom astral e boa vontade em me ajudar. Obrigado também ao Márcio, André e Juliana.

Ao professor Robson pela ajuda e hospitalidade. À Marilene pelo grande apoio em várias técnicas e todos os amigos do Laboratório de Hipertensão.

Ao Kandel, meu companheiro leal.

E a todos que me fizeram sorrir, chorar, ser feliz, crescer, aprender, amar e me tornar quem hoje sou e almejar ser melhor a cada dia.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Aprendizagem e Memória.....	16
1.1. O Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	20
1.2. O Sistema renina-angiotensina no cérebro	25
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Camundongos	35
4.2. Esquiva Inibitória	36
4.3. Labirinto em Y	37
4.4. Reconhecimento de objetos	37
4.5. Drogas	40
4.6. Radioimunoensaio.....	41
4.6.1. Radioimunoensaio para Angiotensina II.....	43
4.6.2. Radioimunoensaio para a Angiotensina-(1-7).....	44
4.7. Delineamento Experimental.....	45
4.8. Análises estatísticas	47
5. RESULTADOS	49
5.1. Esquiva Inibitória	50
5.2. Labirinto em Y	51
5.3. Tarefa de Reconhecimento de Objetos	52
5.3.1. Reconhecimento de Objetos – componente novidade.....	52
5.3.2. Reconhecimento de Objetos – componente temporal	53
5.3.3. Reconhecimento de Objetos – componente espacial	55
5.4. Papel dos receptores AT ₁ e AT ₂ no déficit de memória de reconhecimento de objetos de animais MasKo	56
5.4.1. Reconhecimento de Objetos após administração de salina.....	57
5.4.2. Reconhecimento de Objetos após administração de PD123319	58
5.4.3. Reconhecimento de Objetos após administração de Losartan ...	59
5.4.4. Resultados agrupados dos efeitos de bloqueadores de AT ₁ e AT ₂ sobre a memória do tipo episódica.....	60
5.5. Níveis de angiotensina (1-7) no cérebro de animais MasKo	62
5.5.1. Quantificação da Angiotensina-(1-7) hipocampal e cortical	63
5.5.2. Quantificação da Angiotensina II hipocampal e cortical.....	64
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

¹²⁵I – Iodo radioativo

ACN - Acetonitrila

ACTH – Hormônio adreno-cortico trópico

ADH – Hormônio anti-diurético

Ang I – Angiotensina-(1-10)

Ang II – Angiotensina-(1-8)

Ang IV – Angiotensina-(3-8)

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)

AT₁ – Receptor do tipo 1 de Angiotensina II

AT₂ – Receptor do tipo 2 de Angiotensina II

BSA – Albumina do Soro Bovino

C57BL/6 – Linhagem de camundongo de pelagem escura utilizado em experimentos de pesquisa laboratorial

CA1 – Região 1 do dorso do hipocampo. A abreviatura vem do latim “Corno de Ammon”.

CaMKII – Proteinocinase dependente de cálcio-calmodulina

CREB – Elemento ligador responsivo da Adenosina Monofosfato cíclico

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM – Erro Padrão da Média

ERK – Cinase reguladora de sinal extracelular

FVBn – Linhagem de camundongo albino utilizado em experimentos de pesquisa laboratorial

HFBA – ácido heptafluobutírico

IP - Via intraperitoneal

LH – Hormônio Luteinizante

LTD – Depressão de Longo Prazo

LTP – Potenciação de Longo Prazo

MAPK – Proteinocinase ativada por Mitógeno
MasKO – Animais nocautes para o receptor Mas
MasR – Receptor Mas
MCD – Memória de Curta Duração
MLD – Memória de Longa Duração
MT – Memória de Trabalho
NaCl – Cloreto de Sódio
NEP – Nepsilina
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal
NO – Óxido Nítrico
PD123319 – Antagonista do receptor AT₂ de Angiotensina II
PKA – Proteinocinase dependente de Adenosina mono-fosfato cíclico
PKC – Proteinocinase C
PKG – Proteinocinase G
POP- Prolil oligopeptidase
RIE - Radioimunoensaio
RNA – Ácido Ribonucléico
RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro
RO – Reconhecimento de Objetos
ROS – Espécies reativas de oxigênio: radicais livres
RPM – Rotações por minuto
SC – Via subcutânea
SNC – Sistema Nervoso Central
SNS – Sistema Nervoso Simpático
SRA – Sistema Renina-angiotensina
TOP - Thimet pepitidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação das memórias quanto ao conteúdo e quanto à duração	16
Figura 2	Uma visão atual do SRA e as principais vias biossintéticas da Angiotensina-(1-7).....	22
Figura 3	A estrutura química do heptapeptídeo Ang-(1-7)	24
Figura 4	Desenho representativo da tarefa de reconhecimento de objetos	40
Figura 5	Design experimental: Avaliação comportamental dos animais Masko.	46
Figura 6	Design experimental: Avaliação do efeito do bloqueio dos receptores de Angiotensina II sobre a memória do tipo episódica de animais Masko e FVBn.....	46
Figura 7	Design experimental: Quantificação por radioimunoensaio das angiotensinas II e (1-7) cerebrais em animais Masko e FVBn.....	47
Figura 8	Desempenho de animais Masko e FVBn na tarefa de esQUIVA inibitória.....	50
Figura 9	Comportamento de alternância espontânea (CAE) de animais Masko e FVBn no labirinto em Y.	51
Figura 10	Desempenho de animais Masko na tarefa de reconhecimento de objetos, componente novidade.	53
Figura 11	Desempenho de animais Masko na tarefa de reconhecimento de objetos, componente temporal.....	54

Figura 12	Desempenho de animais MasKo na tarefa de reconhecimento de objetos, componente espacial.....	55
Figura 13	Efeito da injeção subcutânea de salina sobre a memória do tipo episódica em animais MasKo e FVBn.....	57
Figura 14	Efeito da injeção subcutânea de PD123319 sobre a memória do tipo episódica em animais MasKo e FVBn.....	59
Figura 15	Efeito da injeção de Losartan sobre a memória do tipo episódica em animais MasKo e FVBn.....	60
Figura 16	Efeito da administração de salina, losartan e PD123319 sobre a MCD de animais MasKo e FVBn	61
Figura 17	Efeito da administração de salina, losartan e PD123319 sobre a MLD de animais MasKo e FVBn	62
Figura 18	RIE: Concentrações basais cerebrais de Angiotensina II. ...	63
Figura 19	RIE: Concentrações basais cerebrais de Angiotensina-(1-7)	64
Figura 20	Principais vias de sinalização intracelular de AT ₁ e receptor Mas em neurônios.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Substratos neurais envolvidos e tarefas utilizadas para se avaliar os principais tipos de memórias em roedores.....	20
Tabela 2	Efeitos cardiovasculares mediados pelos receptores das angiotensinas.....	25
Tabela 3	Distribuição dos principais receptores angiotensinérgico no cérebro de roedores.....	27
Tabela 4	Tempo de exploração dos objetos durante a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, componente novidade	53
Tabela 5	Tempo de exploração dos objetos durante a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, componente temporal	54
Tabela 6	Tempo de exploração dos objetos durante a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, componente espacial.....	56

RESUMO

Além da função clássica moduladora cardiovascular, o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) também é capaz de modular funções cognitivas, como ansiedade e memória. A Angiotensina-(1-7), um dos mais recentes membros reconhecidamente ativos do SRA, tomou lugar de destaque por ter ações por vezes antagônicas ao principal peptídeo deste sistema: a Angiotensina II. Estudos *in vitro* revelaram que estes efeitos antagônicos ocorrem também no tecido cerebral, pelo menos para protocolos eletrofisiológicos. O principal receptor para a Angiotensina-(1-7) é chamado receptor Mas. Camundongos nocaute para este receptor têm se mostrado uma ferramenta útil para o estudo do papel biológico do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas. Neste trabalho, utilizamos os animais nocautes para o receptor Mas (MasKo) afim de investigar a modulação da memória pelo eixo Ang-(1-7)/receptor Mas. Utilizamos o protocolo de reconhecimento de objetos (RO) para avaliar a memória do tipo episódica. Nossos resultados mostraram que as memórias de trabalho e aversiva não foram prejudicadas nestes animais. No entanto, os animais MasKo possuem déficit na memória do tipo episódica. Assumindo que o déficit de memória poderia ser devido a uma estimulação inespecífica de receptores de Angiotensina II pela Angiotensina-(1-7) cerebral, bloqueamos farmacologicamente os receptores AT₁ e AT₂. Observamos que os animais MasKo tem o déficit de memória revertido quando os receptores AT₁ estão bloqueados. Além disso, a quantificação por Radioimunoensaio das angiotensinas cerebrais revelou níveis de Angiotensina-(1-7) dez vezes superiores nos hipocampus de animais MasKo quando comparados aos animais controle. Nosso trabalho

sugere que com a deleção do receptor Mas a Angiotensina-(1-7) no cérebro de animais MasKo atinge concentrações basais suficientes para estimular receptores de Angiotensina II do tipo AT₁, cuja ativação prejudica a memória. Logo, nossos resultados apontam para uma modulação específica da memória do tipo episódica pelo eixo Ang-(1-7)/receptor Mas.

Palavras-chave: Memória do tipo episódica, tarefa de reconhecimento de objetos, Sistema Renina-angiotensina Cerebral, Angiotensina-(1-7), Receptor Mas

ABSTRACT

Besides the classical modulatory function on cardiovascular system, the Renin-angiotensin system (RAS) also can act locally in many body tissues, regulating other functions than blood pressure. In the central nervous system, the RAS is able to modulate cognitive functions, like anxiety and memory. One of the most recent known active member of RAS is the Angiotensin-(1-7), that took place of prominence due its antagonistic actions to Angiotensin II, the main peptide of the RAS. *In vitro* studies showed that antagonistic effects can occur also in the brain tissue, at least using electrophysiological protocols. The main receptor for Angiotensin-(1-7) is the Mas receptor, and a knockout mice for Mas gene seems to be a good model to study the biologic action of the activation of Ang-(1-7)/Mas receptor. In this study we used these animals to investigate memory modulation of Ang-(1-7)/Mas receptor axis. To study episodic-like memory we used object recognition task (ORT). Our results show that MasKo mice have a deficit in episodic-like memory, but no other deficits were observed in protocols like Y maze or inhibitory avoidance task. Our hypothesis is that the deficit found in the MasKo mice is due to an activation of Angiotensin II receptors (AT₁ and AT₂). To test this hypothesis we blocked pharmacologically the AT₁ and AT₂ receptors and observed the reversion of memory deficits in MasKo after AT₁ receptor blockade but not AT₂. We also performed radioimmunoassay to quantify the angiotensins II and (1-7) in the MasKo mice brain, and found a 10 fold more hippocampus Angiotensin-(1-7) in MasKo compared to the controls. In this work we suggest a non-specifically activation of the AT₁

receptor by Angiotensin-(1-7) and this phenomena causes the episodic-like memory deficit observed in MasKo mice.

Keywords: episodic-like memory, object recognition task, brain renin-angiotensin system , Angiotensin-(1-7), Mas Receptor

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aprendizagem e Memória

A memória pode ser conceituada como o processo constituído pelas etapas de aprendizagem, formação, conservação e evocação de informações (Lent, 2008).

As memórias podem ser classificadas de acordo com a sua duração e também quanto ao seu conteúdo (Figura 1) (Tulving 1972 , Izquierdo 1999, Kandel, 2000).

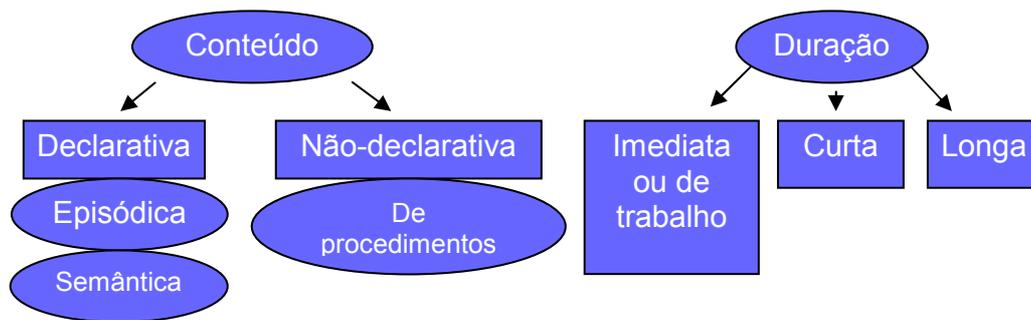


Figura 1 – Classificação das memórias quanto ao conteúdo e quanto à duração.

Quanto a sua duração elas podem ser imediatas, de curta ou longa duração. As memórias imediatas, ou ultra-rápidas, têm como melhor exemplo a memória de trabalho (MT), que é a capacidade de associar uma nova informação e compará-la a uma já existente (Goldman-Rakic, 1991; revisado por Baddley, 1996). A MT tem duração de segundos a minutos, atua com mínimas conseqüências bioquímicas, decorrentes da atividade eletrofisiológica momentânea. É uma memória que não deixa traços e grande parte se perde por completo (Izquierdo, 2002). É processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal, que age em conjunto com outras

regiões cerebrais, como por exemplo, o córtex entorrinal, córtex parietal superior, córtex cingulado anterior e hipocampo (Izquierdo et al., 1998).

A memória de curta duração (MCD) corresponde ao traço mnemônico que se mantém instável por algumas horas, mas que pode ser acessada durante este período. É muito provável que durante a formação desta memória, a expressão gênica e a síntese protéica não ocorram, requisitos importantes para a formação de uma memória estável (Izquierdo et al. 1998 ; Vianna et al., 1999). Em resumo, esta memória está disponível até que haja mecanismos de consolidação necessários à estabilidade. A MCD recruta principalmente a região CA1 do hipocampo e suas projeções para o córtex entorrinal (Izquierdo, 2002).

Outro tipo de memória, ainda com relação à sua duração, é a memória de longa duração (MLD). A MLD é uma memória que necessita de estabilização para se formar, ou seja, é dependente de síntese protéica e por isso é considerada uma memória estável. Sua formação envolve processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais e requer entre três a oito horas para ser consolidada, provavelmente utilizando mecanismos semelhantes aos da LTP (Withlock et al, 2006). A MLD pode ter o mesmo conteúdo que a MCD, mas suas informações não se perdem facilmente e podem ser evocadas por dias ou anos. Comparativamente, a MLD possui mecanismos bioquímicos distintos da MCD (Izquierdo, 2002; McGaugh, 2000).

A MLD é uma memória dependente de síntese protéica já que agentes farmacológicos inibidores de síntese protéica prejudicam a sua

formação. Alterações na liberação de neurotransmissores e na eficiência da comunicação entre neurônios no hipocampo, córtex cerebral e outras estruturas cerebrais, antecedem a síntese protéica, e parecem ser eventos neuroquímicos primários para a formação da MLD (Izquierdo e McGaugh, 2000).

Quanto ao seu conteúdo, podemos classificar as memórias, como não-declarativa (procedural, implícita) ou declarativa (explícita). A memória procedural refere-se ao aprendizado de habilidades motoras e sensoriais, além dos hábitos e condicionamentos a respostas emocionais. Ela pode ser adquirida de forma imperceptível, e nesta, o aprendizado é lento e gradual, porém, pode durar por toda a vida (revisado por Bear et al. 2002; Izquierdo 2002). Já a memória declarativa é genuinamente humana, uma vez que somos capazes de declarar, ou seja, verbalizar o que aprendemos, bem como o período e o local onde determinado aprendizado ocorreu. Este tipo de memória, ao contrário da memória não-declarativa, é de aprendizagem mais rápida, porém é muito mais instável e sujeito a interferências na manutenção da informação (revisado por Izquierdo, 2002). A memória declarativa pode ser associada ao armazenamento de fatos ou de eventos ocorridos, sendo o conceito mais próximo de memória que usamos no dia a dia. Um dos principais componentes da memória declarativa é a memória de eventos, denominada *episódica*.

A Memória episódica é tida como um dos principais sistemas de memórias neurocognitivas, pois provê informações sobre *o que e quando* ocorreu um específico evento ou, ainda mais, sobre *onde* ele aconteceu. A

memória episódica já foi descrita como um tipo de memória estritamente humana (revisado por Tulving e Markowitsch, 1998; Conway et al., 1995; Suddendorf e Corballis, 1997), uma vez que os seres humanos usam a linguagem para adquirir, codificar, guardar e evocar as memórias (Lent, 2008). Há poucos anos Clayton (1998) descreveu evidências claras nas quais os animais possuíam características deste tipo específico de memória humana, porém a descreveu como uma *memória semelhante à episódica* (episodic-like memory). Embora o estudo morfológico possa comparar e diferenciar cérebros humanos de animais, o estudo cognitivo comparativo perfeito não é possível. Assim, a memória declarativa em animais é considerada memória “semelhante” a episódica por não existirem formas de identificar se esta lembrança é, conscientemente, acompanhada de recordação (revisado por Clayton et al., 2007; Griffiths et al., 1999; Clayton et al., 1998).

Uma das formas de se investigar o processamento de uma informação do tipo episódica em animais é através da tarefa de reconhecimento de objetos (TRO). Em roedores, esta tarefa foi descrita por Ennaceur e Delacour (1988) como um teste de memória baseado na exploração diferencial de um objeto familiar e outro não familiar, ou novo. Assim, possui uma característica interessante, pois, baseia-se em um comportamento espontâneo. Desta forma é livre de componentes como, repetições condicionais de reforço e associação de estímulos-resposta. Pode também ser considerado como um teste sem uso de memória de trabalho, já que é livre de componentes de memória com referenciais prévios (Ennaceur e Delacour 1988, revisado por Dere et al., 2007).

A base neurobiológica dos diferentes tipos de memória é bastante diversificada e complexa. A tabela 1 mostra que para cada tipo de memória, substratos neurais diferentes são recrutados e protocolos experimentais são utilizados para se avaliar estas memórias.

Além dos neurotransmissores clássicos, diferentes sistemas hormonais parecem modular a formação e a evocação de memórias. Dentre os sistemas moduladores, o sistema renina-angiotensina têm se mostrado bastante promissor, conforme estudos emergentes na literatura científica.

<i>Memória Avaliada</i>	<i>Tarefa</i>	<i>Substratos neurais recrutados</i>
Associativa aversiva	Esquiva Inibitória	Hipocampo, cortex entorrinal, parietal posterior, amígdala e septo medial
Trabalho	Alteração Espontânea no labirinto em Y	Hipocampo e septo medial
Tipo Episódica	Reconhecimento de Objetos	Córtex perirrinal e Hipocampo

Tabela 1 – Substratos neurais envolvidos e tarefas utilizadas para se avaliar os principais tipos de memórias em roedores.

1.1. O Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

Há mais de um século, Tigersted e Bergman (1898) analisaram extratos salinos provenientes de rim de coelho e identificaram propriedades de reatividade vascular, bem como de controle sobre a hipertensão arterial. Mais tarde, já com conhecimentos básicos sobre o papel do rim na

regulação pressora sistêmica, foram identificadas as angiotensinas (Skeggs et al., 1956), com relação à nomenclatura, em 1940, o grupo argentino liderado por Braum-Menendez et al. (1940) e, independentemente, Page e Helmer (1940) na Clínica Cleveland publicaram que a renina atuava sobre um substrato protéico plasmático, gerando o verdadeiro princípio pressor, um peptídeo que os primeiros denominaram hipertensina e o segundo grupo denominou angiotonina. Posteriormente, ficou acordado que o peptídeo seria denominado angiotensina.

Ao conjunto das cascatas bioquímicas de síntese das angiotensinas dá-se o nome de Sistema Renina-Angiotensina, o qual age como um sistema endócrino-fisiológico vital para a regulação da pressão arterial (Santos et al., 2003; Machado et al., 1999 ; Fontes et al., 1994 ; Ferrario et al., 1997 e 1998).

O precursor dos peptídeos do SRA é o angiotensinogênio, uma glicoproteína hepática que é hidrolizada pela renina, enzima pertencente à família das aspartilproteases e secretada pelas células justaglomerulares renais. Como produto desta reação ocorre a formação do decapeptídeo angiotensina I, que pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), que é produzida pelas células endoteliais especialmente do leito vascular pulmonar, dá origem a Angiotensina II (1-8). Dentre os peptídeos que compõem este sistema, a Angiotensina II (Ang II) tem sido o principal alvo de estudos, uma vez que participa da fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial sistêmica (Ferrario, 2006; Haas e Goldblat, 1959; Genest, 1961).

Recentemente, estudos têm demonstrado que vários dos efeitos biológicos antes atribuídos somente à Angiotensina II podem ser devido a outros membros da família de angiotensinas. Desta forma, outras angiotensinas, como as Angiotensina III, IV e a (1-7), têm despertado interesse devido sua participação no controle da pressão sanguínea, reflexos cardiovasculares, como baro e quimiorreflexo, além de fenômenos de proliferação e sinalização celular e tecidual (Paton et al., 2001; Tallant et al., 2005 ; Di et al., 2008 ; Siejka et al. 2006 ; Lu et al., 2005 ; Ptasinska-Wnuk et al., 2003).

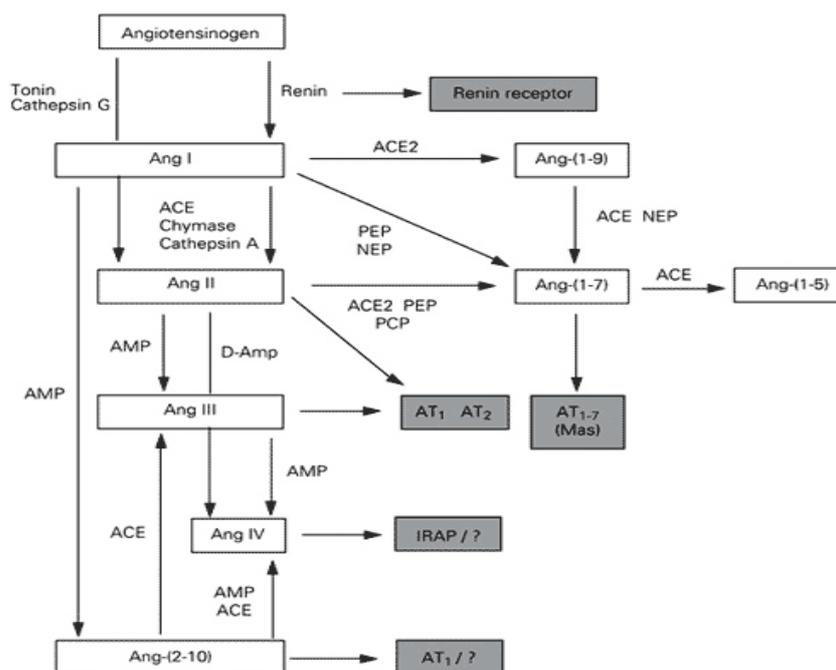


Figura 2 – Uma visão atual do SRA e as principais vias biossintéticas da Angiotensina(1-7). Retirado de Ferreira e Santos (2005).

O conhecimento passou a ser ampliado, não somente por se conhecer outros peptídeos angiotensinérgicos biologicamente ativos, mas

também porque aos poucos sua rede de síntese começou a se tornar mais clara (Figura 2). Recentemente, foi identificada uma nova enzima, a “enzima conversora da angiotensina tipo 2” - ECA2 (Donogue et al., 2000; Tipnis et al., 2000). A ECA2 remove apenas um resíduo de aminoácido da extremidade carboxílica, transformando a Ang I em Ang-(1-9) e removendo também o último resíduo de aminoácido da Ang II, produzindo Ang-(1-7) (Donogue et al., 2000; Vickers et al., 2002). Dessa forma, a ECA2 previne o acúmulo de Ang II e favorece a formação de Ang-(1-7). Interessantemente, sua atividade não é bloqueada pelos inibidores clássicos da ECA, com a qual ela mantém uma homologia da ordem de 42% (Donogue et al., 2000 ; Tipnis et al., 2000).

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo (Figura 3) que exerce atividade sobre o controle cardíaco, pressão arterial, bem como crescimento celular (Ferrario et al., 1998; Trask e Ferrario 2007). Alguns efeitos da Ang-(1-7) são, por vezes, antagônicos aos da Ang II (Tabela 2). Enquanto a última é um potente vasoconstritor e estimula a proliferação celular, a primeira atua como vasodilatador e tem efeito anti-proliferativo sobre cardiomiócitos (Freeman et al., 1996 ; Daemen et al., 1991 ; Sue et al., 1998, Wackenfors, 2004 ; Tallant et al., 2005 e Strawn, 1999).

A Ang-(1-7) pode ser sintetizada por duas vias clássicas. A primeira via é catalisada principalmente pela ECA2, que converte Ang II em Ang-(1-7), como descrevemos anteriormente (Ferrario et al., 2006). Esta reação também pode ser catalisada pela prolil-oligopeptidase (POP). A segunda via ocorre pela conversão direta de angiotensina I em Ang-(1-7), catalisada pela

POP, pela nepresilina (NEP) e pela Thimet peptidase (TOP) (Trask e Ferrario, 2007).

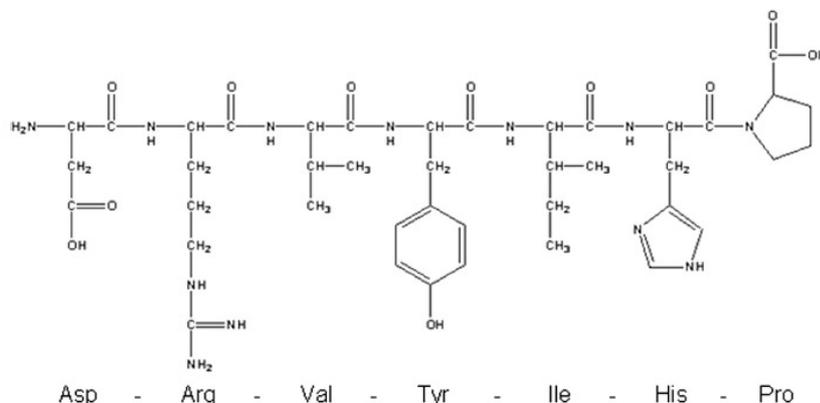


Figura 3. A estrutura química do heptapeptídeo Ang-(1-7). Extraído de Trask e Ferrario (2007).

As duas vias podem ser observadas na figura 2, onde também estão representados os principais receptores para Ang II, AT₁ e AT₂, e para Ang-(1-7), o receptor Mas, que inicialmente foi descrito como um receptor para a Ang II (Jackson et al. 1988), o que não foi confirmado por estudos posteriores, que demonstraram que este é, na verdade, o receptor endógeno para a Ang-(1-7) (Santos et al. 2003).

O receptor Mas foi clonado, sequenciado e identificado como um protooncogene que codifica uma proteína hidrofóbica com sete domínios transmembrana (Brown, 1989). Esta proteína, quando estimulada, ativa uma proteína intracelular ligada ao nucleotídeo guanina. Foi sugerido, então, que a proteína Mas poderia ser um receptor que, ao ser ativado, atuaria em uma via metabólica relacionada à regulação do crescimento celular (Young et al.,

1988). Além disso, pela semelhança na seqüência da proteína Mas, sugeriu-se que pertencesse à família de receptores de alguns hormônios (Young et al., 1986). Os mesmos autores e outros (Bunnemann et al., 1990) mostraram a expressão do RNAm de Mas em regiões do sistema nervoso central (SNC), principalmente no hipocampo e no córtex cerebral.

Tabela 2 Efeitos Cardiovasculares mediados pelos receptores angiotensinérgicos		
Adaptado de Ferreira e Santos (2005).		
Angiotensina	Receptor	Ações
Ang II	AT ₁	Vasoconstrição e efeito pressor Aumento do inotropismo e cronotropismo Efeito arritmogênico Remodelamento e proliferação celular Trombose e inflamação
Ang II	AT ₂	Inibição da proliferação celular Apoptose Vasodilatação(?)
Ang-(1-7)	AT _{1,7} (Mas)*	Vasodilatação Potenciação da vasodilatação induzida pela BK Efeito anti-arritmogênico Aumento da função contrátil pós-isquêmica Inibição da proliferação celular
Ang-(3-8) (Ang IV)	AT ₄ (IRAP)?	Vasodilatação Inibição da proliferação celular
Des-Asp1-Ang I	AT ₁ /?	Inibição da proliferação celular induzida por Ang II

* Ações mediadas pelo Mas foram listadas baseados em evidências diretas e indiretas (bloqueio por A779). Ang = angiotensin ; BK = bradicinina ; IRAP = aminopeptidase regulada por insulina.

1.2. O Sistema renina-angiotensina no cérebro

Recentemente o conceito clássico de que o SRA atua necessariamente de maneira circulante/hormonal vem sendo alterado. Técnicas modernas de biologia molecular demonstraram, por exemplo, que RNAs mensageiros de peptídeos e receptores do SRA não se limitam aos órgãos tradicionais (rim e fígado, principalmente), mas são encontrados

largamente nos mais diversos tecidos corporais. Esses achados sugerem que os tecidos podem produzir e secretar peptídeos angiotensinérgicos, e que estes não necessariamente atuam sistemicamente, mas de maneira local, agindo de forma intácrina, autócrina e/ou parácrina (Brosnham et al., 1988; Dzau, 1988; Lindpaintner e Ganten, 1991; Baltatu et al., 2000).

Philips e Oliveira (2008) e Bader e Ganten (2008) sugerem através de suas revisões que há um SRA no tecido cerebral, com síntese e metabolismo próprio de peptídeos, enzimas e receptores.

Concordando com esta afirmação, und Halbach e Albrecht (2006) revisam a distribuição de receptores angiotensinérgicos no cérebro de roedores, conforme mostrado na tabela 3 abaixo, onde estão listados os principais receptores angiotensinérgicos em duas regiões importantes para o processamento cognitivo: o córtex cerebral e a formação hipocampal.

Área		Receptor			
		AT1	AT2	AT4	Mas
Córtex	Córtex Frontal	-	-	+	+
	Córtex Parietal	-	-	+	+
	Córtex Piriforme	+	-	+	+
	Córtex Entorrinal	+	-	+	+
	Córtex Insular	-	-	+	+
	Córtex Congulado	+	+	-	+
Hipocampo	CA1	+	+	+	+
	CA2	+	+	+	+
	CA3	+	+	+	+
	Giro denteado	+	+	+	+
	Subículo	+	-	-	+

Tabela 3. Distribuição dos principais receptores angiotensinérgico no cérebro de roedores.

Adaptado de und Halbach e Albrecht (2006) e com dados de Walther et al (1998).

Sobre a atuação da Ang II no sistema nervoso, é conhecido seu efeito interativo com o Sistema Nervoso Simpático (SNS), causando facilitação adrenérgica. Além disso, ela exerce inibição central sobre os reflexos comandados pelos barorreceptores (Campagnole-Santos et al., 1992) e tem ação regulatória sobre o mecanismo da sede, aumentando a ingestão hídrica dos animais quando administrada intra-cerebroventricularmente. A Ang II ainda participa dos mecanismos centrais de regulação cardiovascular e modula a ação dos hormônios hipofisários - ACTH, prolactina, LH e ADH (Sánchez-Lemus, 2009 ;Donadio et al., 2004 ; Philips et al., 1995 ; Berne et al., 2004).

Porém, o papel dos peptídeos angiotensinérgicos locais parece não estar restrito à regulação central das pressões corporais ou atividade cardiovascular, atuando também sobre funções cognitivas como o aprendizado, a memória e o estresse.

Raghavendra e colaboradores (2001) demonstraram que a inibição da ECA (pelo captopril, via intraperitoneal) e o bloqueio de receptores AT_1 (Losartan, via intraperitoneal), potencializam a consolidação da memória condicionada ao medo em ratos. Porém, a administração de Ang II intra-hipocampal impede a consolidação desta mesma memória, e este efeito é via receptores AT_2 (Kerr et al., 2005).

Quanto à memória espacial, ratos submetidos ao tratamento crônico com inibidores da ECA melhoraram seu desempenho no labirinto aquático de Morris (Jenkins e Chai, 2007). Corroborando os resultados em animais,

pacientes portadores de Doença de Alzheimer melhoram seu desempenho cognitivo após o uso de inibidores da ECA (Hajjar et al., 2008).

Estudos *in vitro* mostraram que Ang II suprime a LTP - potenciação de longa-duração e a LTD - depressão de longa-duração (Tchekalarova e Albrecht, 2007), correspondentes eletrofisiológicos para a memória (Whitlock et al. 2006 , Pastalkova et al., 2006, Bliss et al. 1993) enquanto a Ang-(1-7) potencializa a LTP (Hellner et al., 2005).

Logo, além da participação da Angiotensina II, a Ang-(1-7), bem como seu receptor Mas também têm sido alvo de estudos acerca de seus papéis no processamento de memórias. O papel fisiológico do receptor Mas pode ser estudado, farmacologicamente, com o auxílio do antagonista A-779 (D-Ala-7-Ang-(1-7)) (Santos et al., 1994) e geneticamente, em camundongos nocautes para este receptor (MasKo) (Walther et al. 1998). Os animais MasKo com background C57Bl/6 apresentam níveis maiores de ansiedade comparado aos animais selvagens (Walther et al., 1998) e maior potenciação de longo prazo – LTP (Hellner et al. 2005), porém não apresentam melhores performances em tarefas que envolvem aprendizagem (Alenina et al., 2007). Estes últimos testes usaram paradigmas que aferem a memória espacial, como o labirinto aquático de Morris. No entanto, não há nenhum dado que mostre a participação do SRA no processamento de outros tipos de memórias (und Halbach e Albrecht, 2006).

Utilizamos neste trabalho camundongos nocautes para o receptor Mas, com background FVBn, para investigar a modulação de diferentes memórias pelo eixo angiotensina (1-7)/receptor Mas.

2. JUSTIFICATIVA

Desde a elucidação de que os receptores Mas são expressos no tecido neural, há grande interesse em se investigar qual o papel que a Angiotensina-(1-7) exerce sobre a atividade cerebral. Algumas investigações eletrofisiológicas apontaram que fenômenos relacionados à memória, como a LTP, são modulados pelo receptor deste peptídeo (Hellner et al. 2005). Esses estudos provavelmente foram motivados pela constatação que peptídeos clássicos do sistema renina-angiotensina, como a Ang II, afetam a memória (Kerr et al. 2005; Bonini et al., 2006).

Uma das regiões de maior expressão dos receptores Mas no tecido cerebral é o hipocampo (Alenina et al., 2007; Metzger et al., 1994), região esta recrutada em processos de aprendizagem e memória (Izquierdo et al., 2002 ; Gerlai, 2001 ; Rossato et al., 2006). Dispomos de um modelo animal genético com deleção do gene que codifica o receptor Mas. Estes animais, portanto, têm reduzida a atividade biológica da Ang-(1-7), sendo um modelo excelente para se estudar o papel deste eixo em componentes fisiológicos como o aprendizado e a memória.

Estudos atuais mostraram que o inibidor da ECA, captopril, utilizado para controle clínico da hipertensão, melhora déficits cognitivos em pacientes, por diminuir os efeitos inibitórios exercidos pela Ang II sobre a memória (Hajjar et al., 2008). E uma vez que a Ang-(1-7) é considerado um peptídeo vasoativo “emergente”, com grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (Iusuf et al., 2008), torna-se extremamente relevante a investigação da participação do eixo Ang-(1-7)/Mas no processamento da memória.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a modulação da memória pelo eixo Ang (1-7) / receptor Mas utilizando como ferramenta camundongos FVBn com deleção do gene para o receptor Mas (MasKo).

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a memória de curta e de longa duração na tarefa de esQUIVA inibitória em camundongos MasKo.
2. Avaliar a memória de trabalho em camundongos MasKo.
3. Avaliar os componentes: novidade, espacial e temporal da memória de reconhecimento de objetos em camundongos MasKo.
4. Investigar o papel de receptores AT₁ e AT₂ na consolidação da memória do tipo episódica em animais nocautes para o receptor *Mas*.
5. Verificar os níveis de angiotensinas II e (1-7) no córtex cerebral e hipocampo de animais MasKo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Camundongos

Os camundongos nocautes para o receptor Mas, bem como seus respectivos controles, camundongos de mesmo background genético, FVBn, foram fornecidos pelo laboratório de Hipertensão Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG.

Todos os animais foram mantidos em estante ventilada, própria para animais de laboratório, com temperatura constante de $22\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade entre 40-70%. A sala onde se localiza esta estante possui controle do ciclo claro-escuro, 12/12 horas. Em cada gaiola foram mantidos de 3 a 5 camundongos com alimento e água *ad libitum*.

Todos os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina. Aqueles cérebros utilizados para as análises bioquímicas foram coletados imediatamente após a decapitação e armazenados em freezer -80°C

Todos os protocolos foram realizados observando-se as normas internacionais contidas no, "Guide For The Care And Use Of Laboratory Animals" Editado pelo "US National Institutes Of Health (NIH publication nº 85 –23 revisado em 1996).

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA - desta universidade (protocolo 167/2008).

4.2. Esquiva Inibitória

A tarefa de esquiva inibitória envolve o aprendizado de uma tarefa aversiva onde, na sessão de treino, o animal recebe um choque de baixa intensidade ao descer de uma plataforma. Na sessão de teste, que pode ocorrer em vários tempos pós-treino, o animal é exposto novamente àquele ambiente, testando-se então sua memória. Para avaliar o quanto o animal aprendeu, mede-se o tempo em que este permanece na plataforma e, conseqüentemente, a retenção da memória. Trata-se de um aprendizado adquirido em uma única tentativa, tornando-o ideal para o estudo de processos iniciados no treino (Izquierdo et al., 2006, Pereira et al. 2005).

Na sessão de treino, o animal foi colocado sobre uma plataforma (8 cm X 21cm e 2 cm de altura) que encontra-se numa das extremidades de uma caixa de acrílico (21cm X 22.5cm X 22.5cm). O assoalho da caixa contém barras metálicas paralelas de 0.1cm de diâmetro espaçadas por 1 cm (Insight Ltda). Após a descida da plataforma o animal recebeu um choque de 0.3mA por 2s, e então foi imediatamente removido da caixa.

Nas sessões de teste, 1.5h (MCD) e 24h (MLD) pós-treino, o animal foi colocado novamente sobre a plataforma e mediu-se o tempo de descida, porém na ausência de choque.

4.3. Labirinto em Y

Esse tipo de labirinto pode ser utilizado para se investigar comportamento de alternância espontânea, que compreende na tendência do animal em alternar duas escolhas e que depende de uma memória de trabalho intacta. O animal deve lembrar em qual braço do labirinto ele esteve na ocasião prévia para poder entrar no braço correto. O animal foi colocado em um dos três braços do labirinto (cada um com 30 cm de comprimento, 20 cm de altura e 6 cm de largura) e durante 8 minutos registrou-se a seqüência dos braços visitados. A análise da porcentagem de alternância (número de alternâncias/total de braços entrados – 2 X 100) e do número de braços visitados foi utilizada como parâmetros de memória de trabalho e atividade locomotora, respectivamente (Hughes, 2004; Pych et al., 2005; Castro et al., 2009).

4.4. Reconhecimento de objetos

O paradigma de reconhecimento de objetos, inicialmente descrito por Ennaceur e Delacour (1988), é baseado nas habilidades exploratórias naturais de roedores expostos a um novo ambiente. Neste paradigma, a diferença de exploração entre um objeto previamente explorado e um novo objeto é tida como um índice de memória. Esta memória é considerada como uma memória do tipo episódica (Dere et al., 2007).

Antes do início do protocolo comportamental, os animais foram manipulados durante 2 minutos durante sete dias. No oitavo dia, o animal

passou por uma sessão de habituação ao contexto (caixa retangular de 50cm X 40cm) durante 10 minutos.

No dia seguinte, durante a sessão de treino, o animal foi colocado novamente no contexto, porém agora contendo dois objetos idênticos e durante 10min foi permitido que o animal explorasse os objetos livremente.

Para medir a memória de curta (1.5h pós-treino) e a de longa (24h pós-treino) duração, os animais foram recolocados na caixa, porém contendo um objeto idêntico e outro novo, e tiveram 10 minutos para explorar os objetos. O protocolo está ilustrado na figura 4.

Consideramos exploração quando o animal cheirou e/ou tocou os objetos com as vibrissas. Todo protocolo foi automatizado pelo programa ANYMAZE®, que consiste em um software de análise on-line que marca virtualmente o focinho do animal e estabelece seu deslocamento na caixa de acrílico, acessando informações sobre distância percorrida e exploração dos objetos. As imagens foram captadas por uma câmera localizada acima do caixa retangular.

Os resultados foram expressos como índice de reconhecimento (tempo de exploração do objeto novo/tempo total de exploração), conforme descrito na metodologia de Prado et al. (2006).

Os objetos escolhidos foram utensílios simples, como garrafas, copos, balões volumétricos, com cores e texturas diferentes, mas sem nenhum tipo de atrativo especial, como um orifício para que o animal pudesse colocar o

focinho ou suporte para que ele o pudesse escalar o objeto. Todos os objetos foram previamente selecionados para impedir que usássemos objetos naturalmente mais atrativos. Aqueles que se mostraram mais atrativos em pelo menos dois testes prévios com dois animais diferentes, não foram utilizados para os experimentos de memória do tipo episódica.

Entre cada sessão de treino ou testes, os objetos foram limpos com álcool 70%, assim também como o contexto, evitando que o animal anterior deixasse algum odor na caixa, através de urina ou fezes, o que poderia ser um atrativo para o próximo animal.

Para se testar o componente espacial da tarefa, os animais foram submetidos a uma fase de treino com dois objetos iguais entre si e 1h depois foram testados, sendo que nessa fase de teste um dos objetos foi disposto em lugar diferente do inicial, ou seja, um dos objetos teve sua posição espacial alterada (Dere et al., 2007). A figura 4 ilustra como foi conduzido este protocolo.

O componente temporal da tarefa de reconhecimento de objetos foi realizado com duas sessões de treino e uma sessão de teste. Em cada sessão de treino o animal foi apresentado a dois objetos iguais entre si, porém diferentes da outra sessão de treino ao qual foi submetido. Logo, os animais foram expostos a dois conjuntos de objetos novos, um em cada sessão. Durante o teste foi usado um objeto do primeiro treino e um do segundo. Espera-se de um animal com memória intacta que explore mais o objeto da primeira sessão de treino, pois durante a sessão de teste, este é o

objeto que temporalmente é menos recente para o animal. A figura 4 ilustra este protocolo.

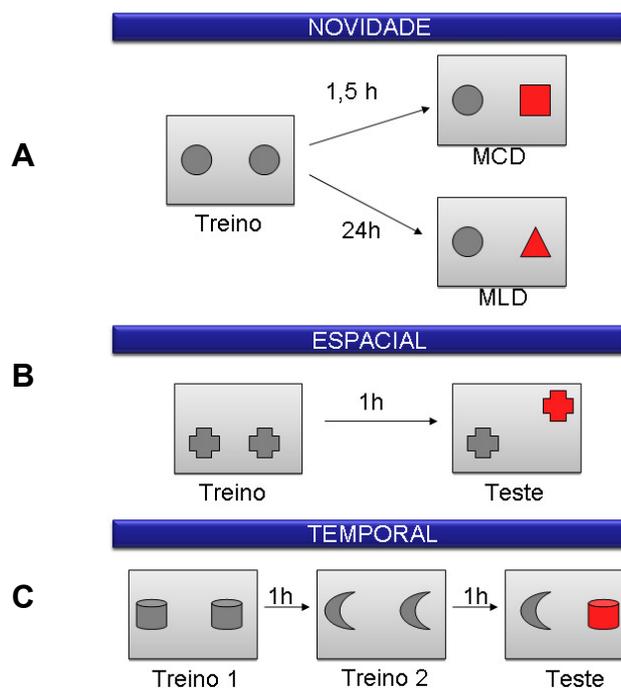


Figura 4. Desenho representativo dos testes de reconhecimento de objetos: (A) Avaliação da MCD e Avaliação da MLD no componente Novidade, (B) Avaliação do componente espacial e (C) Avaliação do componente temporal da tarefa de reconhecimento de objetos. Em vermelho estão grafados os objetos novos, ou que mudaram de lugar ou mais antigos, sendo estes os objetos que se espera serem os mais explorados por um animal com memória intacta, pois sempre representam uma situação nova para a exploração do roedor.

4.5. Drogas

As drogas utilizadas foram:

1. Losartan Potássico (Sigma®), antagonista de receptores AT₁, na concentração de 10mg/kg, administrado 18 e 1h antes do treino, via intraperitoneal (Polidori et al., 1996; Raghavendra et al., 2001; Wang et al., 2003).
2. PD123319 (Sigma-RBI®), antagonista de receptores AT₂, na concentração de 1mg/kg, administrado 12 e 1h antes do treino, via subcutânea (Macova et al., 2008).

Além disso, os grupos de animais controle receberam mesmo volume de salina pela mesma via de administração da droga de interesse, respeitando-se o mesmo intervalo de aplicação das drogas.

4.6. Radioimunoensaio

Foram coletados hipocampo e córtex cerebral (bilateralmente) dos animais MasKo e FVBn. Os tecidos foram imediatamente congelados em freezer -80°C até o momento do experimento.

Os protocolos utilizados seguem a rotina para RIE do Laboratório de Hipertensão Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Botelho et al., 1994; Costa et al., 2003; Simões e Silva et al., 2004 ; Mendes, 2001 ; Velloso, 2003).

A extração das angiotensinas do sobrenadante do homogenato de hipocampo e córtex foi realizada utilizando-se colunas Bond Elut C-18. As

soluções foram passadas pelas colunas com auxílio de uma seringa, de forma que pressão positiva fosse exercida sobre a coluna. A coluna Bond Elut C-18 foi pré-ativada com 20 mL de acetonitrila 99,9% (ACN 99,9%) / ácido heptafluobutírico 0,1% (HFBA 0,1%) e 20 mL de solução aquosa de HFBA 0,1%. A seguir, a coluna foi lavada com 3 mL de Albumina do Soro Bovino (BSA) 0,1% / HFBA 0,1%, 10 mL de ACN 10%/ HFBA 0,1% e 3 mL de HFBA 0,1%. Após a ativação as amostras foram aplicadas na coluna, anotando-se o volume colocado na coluna. Após aplicação das amostras a coluna foi lavada com 20 mL de HFBA 0,1% e 3 mL de ACN 60% / HFBA 0,1%. Os peptídeos foram eluídos com 3 mL de ACN 99,9%/ HFBA 0,1% e armazenados a -20° Celsius em tubos de polietileno, previamente lavados com BSA 0,1%.

O material eluído foi submetido a secagem em estufa evaporadora por 12 horas e estocado à -20° C até o processamento das amostras pelo método de radioimunoensaio.

O Cálculo das concentrações peptídicas foi realizado como segue:

A curva-padrão foi obtida pela relação $B\text{-Br}/(\text{Po-Br}) \times$ concentração de padrão em picogramas (pg).

A concentração de peptídeo (pg/0,1mL) foi determinada pela intersecção da relação $B\text{-Br}/\text{Po-Br}$ na curva-padrão de acordo com a programação do contador de radiação gama, onde:

- B = fração de peptídeo marcado ligado

- Br = branco
- Po = fração de peptídeo marcado ligado na ausência de peptídeo não marcado.

4.6.1. Radioimunoensaio para Angiotensina II

As amostras foram ressuspendidas em 650 μ L de tampão de NaCl 0,9% com ácido acético a 0,03%.

O anticorpo policlonal empregado foi titulado a 1:160.000 a partir de uma solução de estoque de 1:2500. Ele foi diluído em um tampão contendo Tris 0,1 M, EDTA 15 mM e lisosima 0,1%, com pH 7,4 (Tampão 1). Este anticorpo apresenta menos de 0,001% de reatividade cruzada com a Ang I e a Ang-(1-7), menos de 0,002% de reatividade cruzada com a Ang-(1-9) e 100% de reatividade cruzada com a Ang-(2-8), Ang-(3-8) e Ang-(4-8).

A solução contendo Ang II marcada com iodo radioativo (125 I) foi utilizada em um volume correspondente à contagem de 6000 cpm por cada 0,1mL, diluída no tampão 1. A curva-padrão do RIE foi feita utilizando-se diluições progressivas a partir de uma solução-estoque contendo 2 mg/mL de Ang II. Todos os tubos de ensaio receberam 100 μ L de Ang II marcada com 125 I. O tubo “branco” recebeu 100 μ L de tampão 1 e 200 μ L de tampão 2 (Tris-HCl 0,1 M pH 7,4) no lugar da amostra. O tubo padrão “zero” recebeu 100 μ L de anticorpo e 200 μ L de Tampão 2 no lugar da solução padrão. Os

tubos com amostras receberam 200 μL do sobrenadante do homogenato e 100 μL de anticorpo, além de peptídeo marcado.

Os tubos foram então incubados em agitação por 18-22 horas à uma temperatura de 4° C. Após a incubação foram adicionados a todos tubos, exceto o “total”, uma suspensão de carvão ativado. O tubo recebeu 1100 μL de tampão 1, sendo 100 μL correspondente à solução de carvão ativado e 100 μL correspondente ao anticorpo, 200 μL de tampão 2, além de 100 μL de Ang II marcada. Os tubos foram agitados e centrifugados à 4 ° C durante 20 minutos a 2000 rpm. Logo após a centrifugação, o sobrenadante era vertido e a radioatividade contada em contador gama. As concentrações de Ang II foram fornecidas pela programação do próprio contador de radioatividade, a partir da curva-padrão construída. Esta concentração foi então corrigida para o volume eluído da coluna de extração.

4.6.2. Radioimunoensaio para a Angiotensina-(1-7)

Como para Angiotensina II, o sobrenadante do homogenato foi processado e os peptídeos extraídos utilizando-se uma coluna Bond Elut C-18.

O anticorpo empregado foi preparado a partir de uma solução-estoque à 1:500 e titulado em Tampão 1 para 1:20.000. Este anticorpo apresenta menos que 0,001% de reatividade cruzada com a Ang I e a Ang II, 0,01% de reatividade cruzada com a Ang-(4-7) e 0,005% com a Ang-(1-5).

A solução contendo Ang-(1-7) marcada com ^{125}I foi utilizada em um volume correspondente à 600 cpm por cada 0,1 mL, diluída em tampão 1.

A curva-padrão do RIE foi feita utilizando-se diluições progressivas a partir de uma solução estoque contendo 2mg/mL de Ang-(1-7). Todos os tubos de ensaio receberam 100 μL de Ang-(1-7) marcada com ^{125}I . O tubo “branco” recebeu 100 μL de tampão 2 no lugar de anticorpo e 200 μL de tampão 1 no lugar da amostra. O tubo padrão “zero” recebeu 100 μL de anticorpo e 200 μL de tampão 2 no lugar da solução padrão.

A partir deste passo não houve diferenças entre o seguimento de protocolo para o RIE da Ang II, como já descrito anteriormente.

4.7. Delineamento Experimental

- Protocolo 1 – Caracterização comportamental dos animais MasKo

A caracterização comportamental dos animais MasKo avaliou quatro componentes principais: 1) Memória associativa aversiva, na esQUIVA inibitória; 2) memória de trabalho, no labirinto em Y; 3) memória do tipo episódica, no reconhecimento de objetos. O estudo se deu utilizando os paradigmas já descritos anteriormente e não necessariamente cada animal passou por todos os testes comportamentais (figura 5).



Figura 5. Design experimental: Avaliação comportamental dos animais MasKo.

- Protocolo 2 – Efeito de bloqueadores de receptores AT_1 e AT_2 no teste de reconhecimento de objetos.

A figura 6 ilustra o design básico deste protocolo experimental.

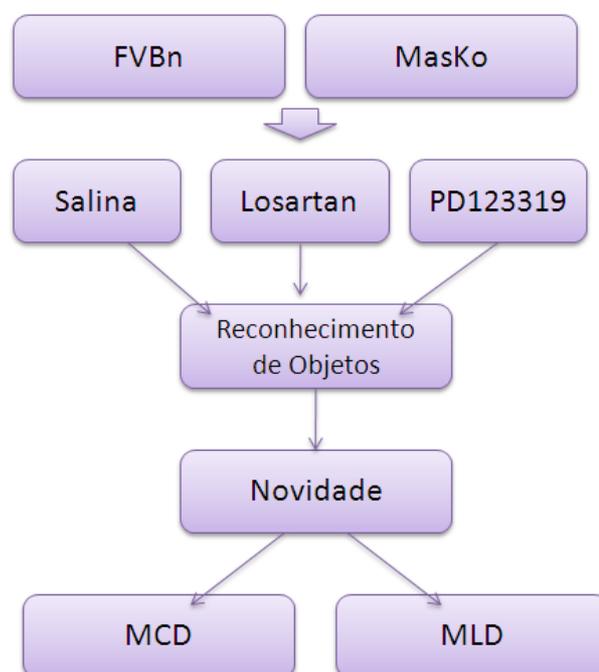


Figura 6. Design experimental: Avaliação do efeito do bloqueio dos receptores de Angiotensina II sobre a memória do tipo episódica de animais MasKo e FVBn.

- Protocolo 3 – Quantificação das angiotensinas cerebrais

Neste protocolo, utilizamos o radioimunoensaio para dosar Ang II e Ang-(1-7) em duas regiões cerebrais, córtex e hipocampo, e o protocolo segue ilustrado na figura 7 abaixo:

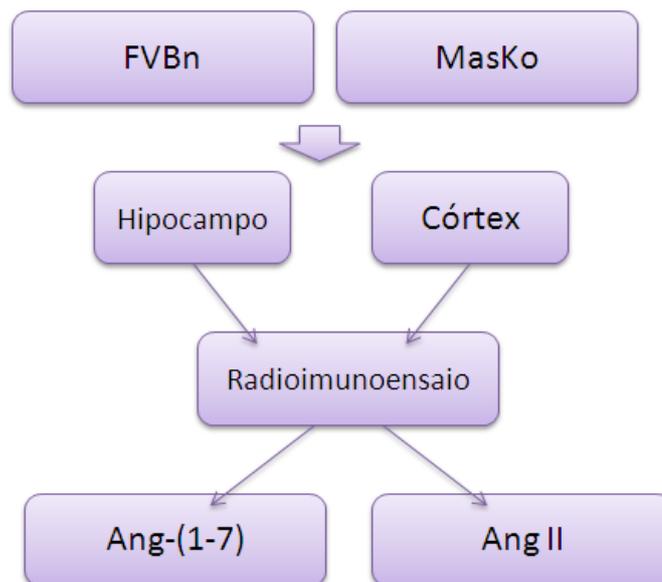


Figura 7. Quantificação por radioimunoensaio das angiotensinas II e (1-7) cerebrais em animais MasKo e FVBn.

4.8. Análises estatísticas

Os resultados de labirinto em Y, radioimunoensaio, reconhecimento de objetos (componente espacial) e tempo bruto de exploração dos objetos

foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e utilizou-se o Teste-*t* de Student não pareado para analisar os dados.

Os resultados de índice de reconhecimento de objetos (componentes novidade e temporal) foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e utilizou-se ANOVA de uma via com post-hoc de Bonferroni para analisar os dados. No caso de agrupamento de resultados, comparou-se o índice de reconhecimento da sessão com o valor hipotético 0.5 utilizando-se o teste T. Índices superiores à 0.5 evidenciam uma preferência exploratória pelo novo objeto.

Os resultados de esquia inibitória, foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson e apresentaram distribuição normal, razão pela qual foi usado um teste paramétrico – Análise de variância de uma via post hoc de Bonferroni para analisar os dados.

Com relação à significância, utilizamos os seguintes critérios para expressá-la:

- * quando o valor de P for menor que 0.05
- ** : quando o resultado o valor de P for menor que 0.01
- *** : quando o valor de P for menor que 0.001.

5. RESULTADOS

5.1. Esquiva Inibitória

A esquiva inibitória é uma tarefa com componente aversivo que avalia memória associativa. Os substratos neurais deste tipo de memória envolvem principalmente o hipocampo, além de compartilhar com a LTP, as mesmas bases moleculares (Izquierdo et al. 2002; Vianna et al., 2000 Withlock et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que os animais MasKo (n=12), bem como seus respectivos controles FVBn (n=17), apresentaram MCD e MLD intactas (fig. 8).

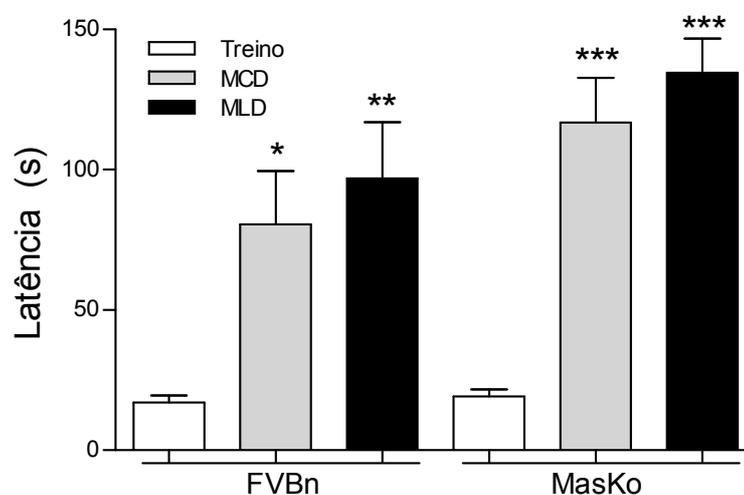


Figura 8: Desempenho de animais MasKo e FVBn na tarefa de esquiva inibitória. Os resultados são expressos em Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). *, ** e *** indicam $P < 0.05$, 0.01 , 0.001 , respectivamente, quando comparado com a latência de treino dentro de cada grupo.

5.2. Labirinto em Y

Como mencionado anteriormente, as memórias podem ser classificadas quanto ao conteúdo e quanto à duração. Portanto, decidimos utilizar o labirinto em Y para avaliar a memória de trabalho, que é uma memória de duração ultra-rápida. Esta memória é sustentada, principalmente, pela atividade elétrica dos neurônios do córtex pré-frontal e por suas projeções para o córtex entorrinal, hipocampo e amígdala (Lent, 2008).

A análise da alternância espontânea mostra que ambos os grupos FVBn ($n=20$) e MasKo ($n=19$) alternaram acima da chance (50%) ($P<0.001$). Além disso, não houve diferença entre os grupos ($P=0.7390$) (figura 9A). Analisamos também o número de braços visitados, como um indicativo de atividade locomotora, e não observamos diferença entre os grupos ($P=0.2785$) (figura 9B).

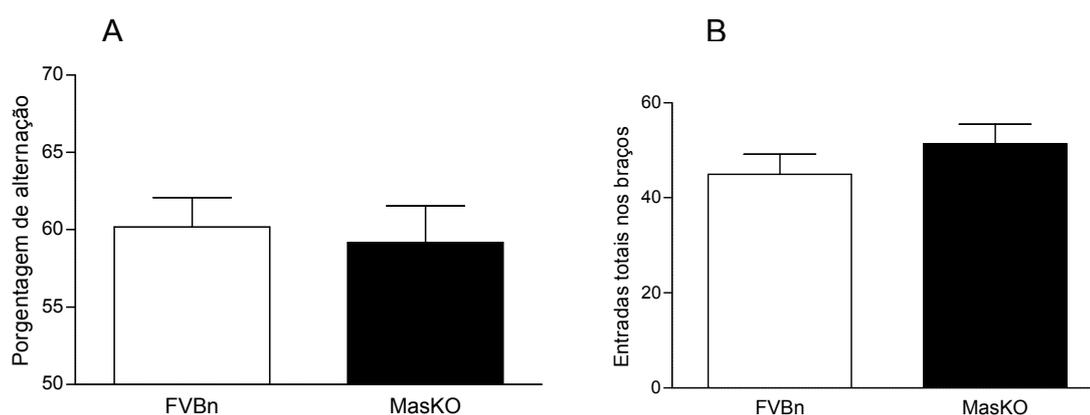


Figura 9: Comportamento de alternância espontânea (CAE) de animais MasKo e FVBn no labirinto em Y. Os dados são expressos como média \pm EPM da (A) alternância espontânea e (B) do número de entradas nos braços do labirinto.

5.3. Tarefa de Reconhecimento de Objetos

5.3.1. Reconhecimento de Objetos – componente novidade

Utilizamos a tarefa de reconhecimento de objetos para avaliar a memória do tipo declarativa em animais MasKo e FVBn. Durante a sessão de treino, ambos os grupos exploraram igualmente os objetos, indicando que os resultados referentes ao processo de aprendizagem e memória não foram resultado de falta de interesse pelos objetos ou tempo de exploração insuficiente durante o treino (tabela 4).

Os animais FVBn apresentaram MCD e MLD intactas, ou seja, durante as sessões de teste estes animais exploraram mais os objetos novos ($n=10$; $F(2,27)=10.96$; $P=0.0003$). Já os animais MasKo foram incapazes de reconhecer o objeto novo em ambas sessões de teste ($n=9$; $F(2,24)=0.7572$; $P=0.4798$).

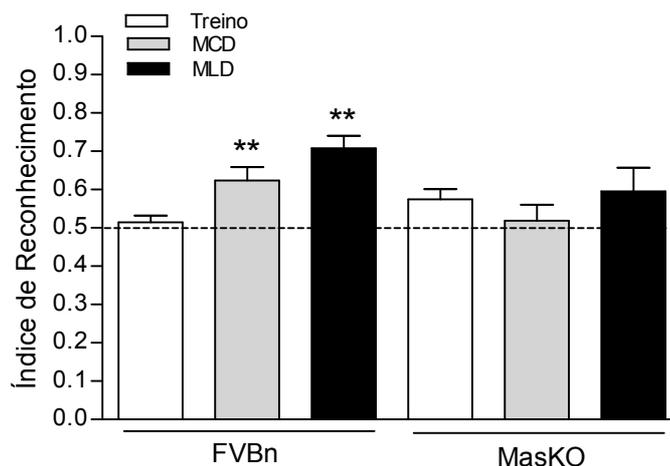


Figura 10. Desempenho de animais MasKo na tarefa de reconhecimento de objetos, componente novidade. Os dados são expressos como média±EPM do índice de reconhecimento. ** indicam $P < 0.01$ quando comparado com o índice de reconhecimento na sessão de treino, dentro de cada grupo.

Exploração durante o treino		
Genótipo	Média (s)	Desvio
	FVBn	44,38235
MasKo	50,80833	16,63213

Tabela 4. Tempo de exploração dos objetos durante a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, componente novidade. Teste T não pareado, $P = 0.2703$.

5.3.2. Reconhecimento de Objetos – componente temporal

A tarefa de reconhecimento de objetos permite que outros componentes, além da novidade, possam ser avaliados (de Castro et al., 2009). Aqui avaliamos o componente temporal, onde a capacidade do animal em reconhecer objetos apresentados em seqüência temporal é

testada. Para isso, espera-se que durante a sessão de teste o animal explore mais o objeto que foi apresentado durante a primeira sessão de treino. Os animais FVBn reconheceram o objeto mais antigo explorando-o mais durante a sessão de teste ($n=10$; $F(2,27)=4.447$; $P=0.0214$), porém o mesmo não ocorreu quando os animais MasKo foram testados ($n=9$; $F(2,24)=2.018$; $P=0.1548$).

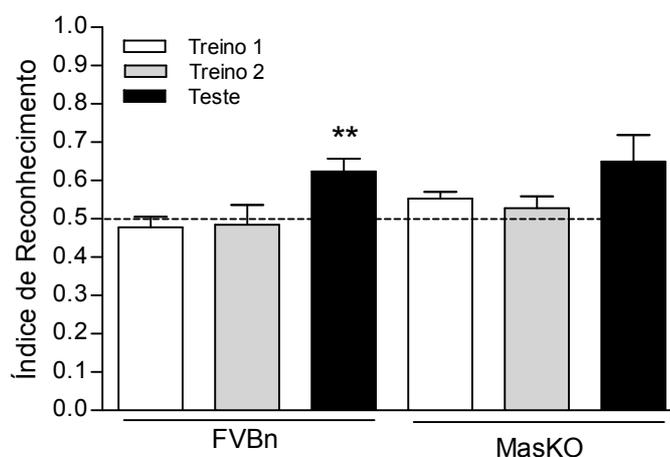


Figura 11. Desempenho de animais MasKo na tarefa de reconhecimento de objetos, componente temporal. Os dados são expressos como média±EPM do índice de reconhecimento. ** indica $P < 0.01$ quando comparado com o índice de reconhecimento nas sessões de treino, dentro do grupo.

<i>Exploração durante as fases de treino</i>				
Genótipo	Treino 1		Treino 2	
	Média (s)	Desvio	Média (s)	Desvio
FVBn	75,869	24,11421	53,426	39,34886
MasKo	43,51	18,08745	58,04286	44,44205

Tabela 5. Tempo de exploração dos objetos durante a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, componente temporal Treino 1: $P=0.5609$; Treino 2 : $P=0.8243$

- Teste T não pareado.

5.3.3. Reconhecimento de Objetos – componente espacial

Neste último protocolo, avaliamos a memória de reconhecimento de objetos, porém utilizando um protocolo onde o componente espacial foi predominante. Este protocolo baseia-se na capacidade do animal reconhecer o objeto que teve sua localização dentro do contexto modificada na sessão de teste. Os animais FVBn foram capazes de reconhecer o objeto com nova localização espacial durante a sessão de teste ($n=10$; $P=0.0002$). No entanto, os animais MasKO apresentaram déficit de memória de reconhecimento de objetos, componente espacial ($n=9$; $P=0.88$).

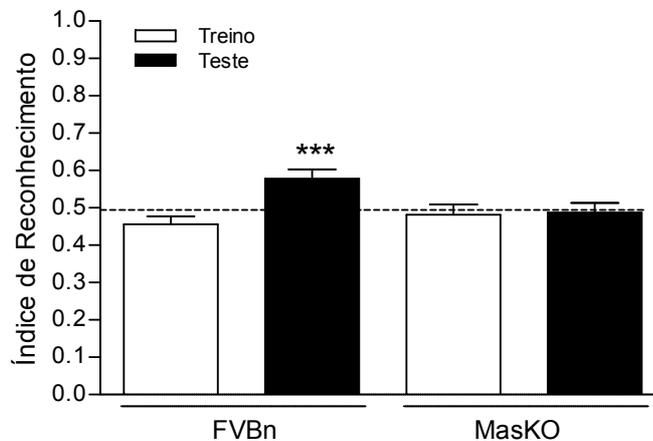


Figura 12. Desempenho de animais MasKo na tarefa de reconhecimento de objetos, componente espacial. Os dados são expressos como média \pm EPM do índice de reconhecimento. *** indica $P < 0.001$ quando comparado com o índice de reconhecimento na sessão de treino, dentro do grupo.

<i>Exploração durante o treino</i>		
Genótipo		
	Média (s)	Desvio
FVBn	43,2432	20,67358
MasKo	47,82368	19,2249

Tabela 6. Tempo de exploração dos objetos durante a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, componente espacial. Teste T não pareado, P=0.4574.

5.4. Papel dos receptores AT_1 e AT_2 no déficit de memória de reconhecimento de objetos de animais MasKo

Observamos um déficit de memória específico nos animais MasKo quando a tarefa utilizada para avaliá-la foi a de reconhecimento de objetos. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que em fatias hipocámpicas de camundongos MasKo ocorre um aumento da LTP e que este aumento é inibido pela administração de Ang-(1-7). Além disso, o bloqueio de receptores AT_1 na presença de Ang-(1-7) bloqueia os efeitos inibitórios da Ang-(1-7) (Hellner et al., 2005). Assume-se então que na ausência de seu receptor Mas, a Ang-(1-7), em altas concentrações, pode ativar receptores AT_1 . Decidimos então verificar qual o efeito de bloqueadores dos receptores AT_1 e AT_2 sobre a memória de reconhecimento de objetos em animais FVBn e MasKo.

5.4.1. Reconhecimento de Objetos após administração de salina

Já que em todos os componentes testados na tarefa de reconhecimento de objetos os camundongos MasKo apresentaram déficit, optamos por utilizar o protocolo novidade, pois podemos avaliar tanto a MCD quanto a MLD. Inicialmente, avaliamos se a injeção *per se* poderia ter algum efeito sobre o desempenho dos animais na tarefa de reconhecimento de objetos. A figura 13 mostra que os animais FVBn foram capazes de reconhecer os objetos novos em ambas sessões de teste (n=7; $F(2,19)=14.94$; $P=0.0001$). Além disso, a administração de salina não alterou o déficit de memória encontrado nos animais MasKo (n= 7; $F(2,20)=1.272$; $P=0.3020$). Não houve diferença quanto ao tempo bruto de exploração dos objetos durante a sessão de treino (FVBn= 23.74 ± 9.45 s; MasKo= 33.44 ± 8.39 s; $P=0.057$).

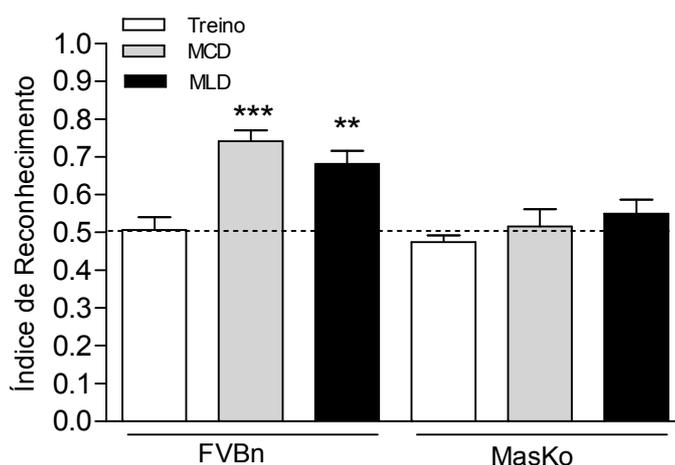


Figura 13: Efeito da injeção subcutânea de salina sobre a memória do tipo episódica em animais MasKo e FVBn. ** indica $P < 0.01$ e *** indica $P < 0.001$ quando comparado com o índice de reconhecimento na sessão de treino, dentro do grupo.

5.4.2. Reconhecimento de Objetos após administração de PD123319

Para verificar o efeito do bloqueio de receptores AT₂ sobre a memória do tipo episódica, administramos 1mg/kg de PD123319, bloqueador seletivo de AT₂, 12 e 1h antes do treino, por via subcutânea nos animais MasKo e FVBn. Estudos de Macova et al. (2008) sugerem que este fármaco é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e bloquear centralmente estes receptores, o que permitiria sua atuação no sistema nervoso central. A administração de PD123319 não alterou a memória de reconhecimento de objetos dos animais controle (n=6; F(2,15)=19.55, P<0.0001) e não reverteu o déficit de memória dos animais MasKo (n=10; F(2,27)=0.800, P=0.4588) (Figura 14). Não houve diferença quanto ao tempo bruto de exploração dos objetos durante a sessão de treino (FVBn= 111.5±31.77 s; MasKo=101.82±39.44 s; P=0.5974).

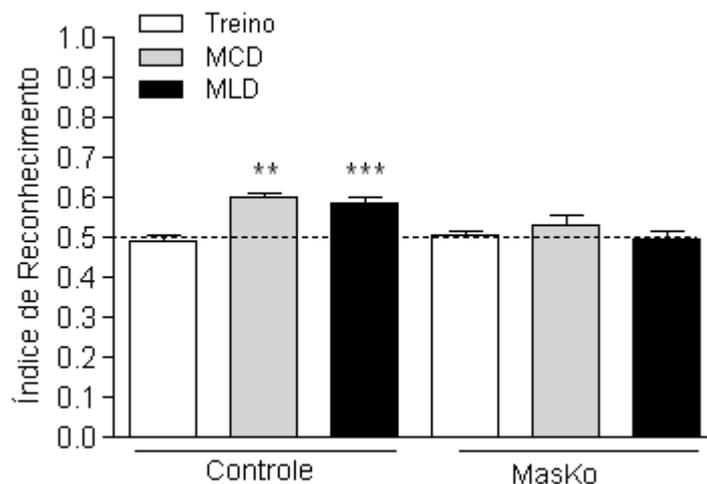


Figura 14: Efeito da injeção subcutânea de PD123319 sobre a memória do tipo episódica em animais MasKo e FVBn. Observou-se que a infusão não alterou a capacidade mnemônica dos animais controles, mas também não foi capaz de reverter os déficits encontrados nos animais nocaute. ** indica $P < 0.01$ e *** indica $P < 0.001$ quando comparado com o índice de reconhecimento na sessão de treino, dentro do grupo.

5.4.3. Reconhecimento de Objetos após administração de Losartan

Para verificar os efeitos do bloqueio do receptor AT_1 sobre a memória do tipo episódica, administramos 10mg/kg de Losartan potássico, bloqueador seletivo de AT_1 , 18 e 1h antes do treino, por via intraperitoneal. Estudos de Polidori et al. (1996), Raghavendra et al., (2001) e Wang et al. (2003) demonstraram que este fármaco atinge o sistema nervoso central quando esta via de administração é utilizada. A infusão de Losartan não alterou o desempenho nos testes de memória de reconhecimento de objetos

do grupo controle (n=7, $F(2,18)=10,43$, $P=0.001$). Porém, a infusão do Losartan foi capaz de reverter os déficits de memória do tipo episódica nos animais MasKo (n=8; $F(2,21)=27.96$; $P<0.0001$) (Figura 15). Não houve diferença quanto ao tempo bruto de exploração dos objetos durante a sessão de treino (FVBn= 32.81 ± 11.67 s; MasKo= 36.35 ± 18.34 s; $P=0.6325$).

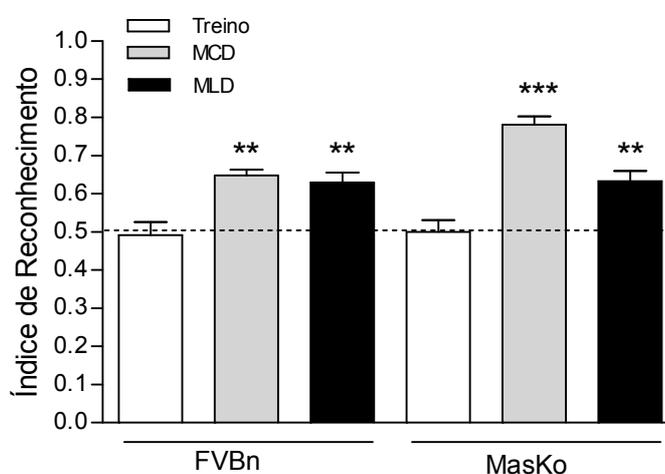


Figura 15: Efeitos da infusão de Losartan sobre a memória do tipo episódica em animais MasKo. A infusão de Losartan não alterou o desempenho nos testes de memória de reconhecimento de objetos do grupo controle e foi capaz de reverter os déficits de memória do tipo episódica nos animais MasKo. ** indica $P < 0.01$ e *** indica $P < 0.001$ quando comparado com o índice de reconhecimento na sessão de treino, dentro do grupo.

5.4.4. Resultados agrupados dos efeitos de bloqueadores de AT_1 e AT_2 sobre a memória do tipo episódica

Para facilitar a percepção dos efeitos da administração de Losartan e PD123319 sobre a memória do tipo episódica nos animais estudados, agrupamos os resultados mostrados nas três figuras anteriores nos dois gráficos abaixo, representados na figura 16 e 17, que mostram respectivamente o efeito observado sobre a memória de curta e de longa duração.

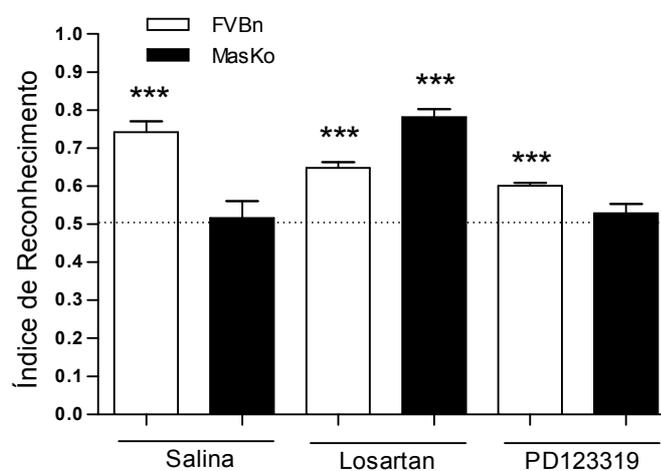


Figura 16: Efeitos da administração de salina, losartan e PD123319 sobre a memória de curta duração de animais FVBn e MasKo. Os resultados são expressos em média \pm EPM. *** indica $P < 0.001$ quando comparado com o ponto médio do índice de reconhecimento de objetos (0.5). Valores superiores a 0.5 revelam preferência na exploração do novo objeto.

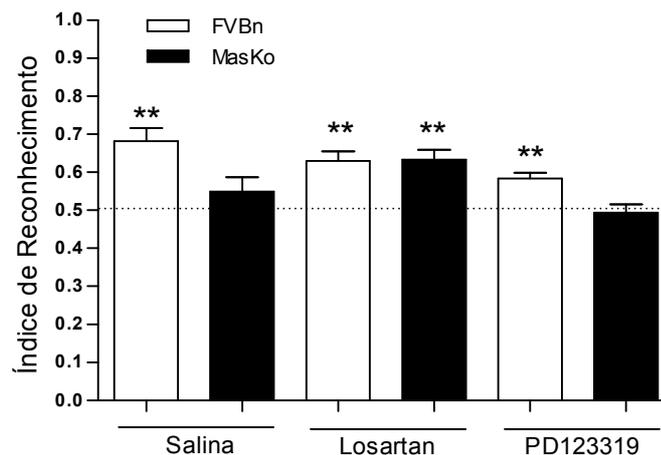


Figura 17: Efeitos da administração de salina, losartan e PD123319 sobre a memória de longa duração de animais FVBn e MasKo. Os resultados são expressos em média \pm EPM. ** indica $P < 0.01$ e *** indica $P < 0.001$ quando comparado com o ponto médio do índice de reconhecimento de objetos (0.5). Valores superiores a 0.5 revelam preferência na exploração do novo objeto.

5.5. Níveis de Angiotensina-(1-7) no cérebro de animais MasKo

Nossos resultados comportamentais mostraram que o déficit de memória encontrado nos animais MasKo pode ser revertido pelo bloqueio de receptores AT_1 , mas não AT_2 . Uma vez que encontramos déficits na memória do tipo episódica observada nos MasKo, que é reversível pelo bloqueio de AT_1 , decidimos conduzir o protocolo de Radioimunoensaio para quantificar o nível basal das angiotensinas cerebrais. Escolhemos a

Angiotensina II, principal ligante de AT_1 e a Angiotensina-(1-7) que também pode se ligar inespecificamente à AT_1 .

5.5.1. Quantificação da Angiotensina-(1-7) hipocampal e cortical

A figura 18 representa o radioimunoensaio para quantificação da Angiotensina-(1-7) em duas regiões cerebrais, córtex e hipocampo. O primeiro foi escolhido como controle e o segundo por ser uma região importante para a memória do tipo episódica. Não foi encontrada significância estatística entre os níveis de Ang-(1-7) corticais entre os genótipos (FVBn, n= 6 e MasKo n=4; $P=0.5540$). Porém, observamos um aumento nas concentrações hipocampais de Ang-(1-7) dos animais MasKo de aproximadamente 10X (FVBn e MasKo: n= 5 ; $P=0,0226$).

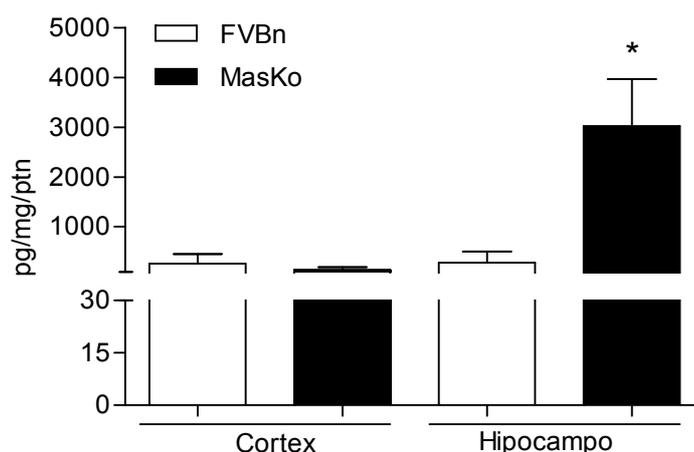


Figura 18: Concentrações basais cerebrais de Angiotensina-(1-7). Os resultados são expressos em média \pm EPM. * indica $P < 0.05$ quando comparado com mesmo tecido em relação ao grupo controle.

5.5.2. Quantificação da Angiotensina II hipocampal e cortical

A figura 19 representa o radioimunoensaio para quantificação da Angiotensina II em duas regiões cerebrais, córtex e hipocampo. Novamente o córtex foi eleito como controle e o segundo por ser uma região importante para a memória do tipo episódica. As concentrações corticais de Ang II não diferiram entre os grupos (FVBn, n=6, MasKo n=4 ; $P= 0.8763$) assim como as concentrações hipocampais (FVBn, n=5, MasKo n=5; $P=0.9469$).

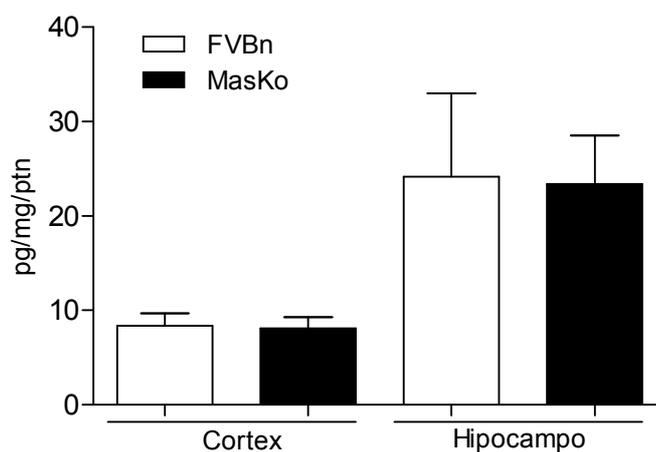


Figura 19: Concentrações basais cerebrais de Angiotensina II. Os resultados são expressos em média \pm EPM.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que camundongos nocautes para o receptor Mas apresentam déficit específico de memória de reconhecimento de objetos, já que as memórias de trabalho e associativa estão intactas. Além disso, o déficit de memória encontrado foi revertido pelo bloqueio pré-aprendizado de receptores AT₁, mas não AT₂. Este último resultado indica que os níveis aumentados de Ang-(1-7) hipocampais, detectados pelo RIE, em decorrência da ausência dos receptores Mas, podem estar ativando inespecificamente os receptores AT₁ e ocasionando os déficits de memória.

Existem várias evidências demonstrando a modulação da memória pelo sistema renina angiotensina, sendo o principal foco a Angiotensina II e seus respectivos receptores. Raghavendra e colaboradores (2001) demonstraram que a inibição da ECA e o bloqueio de receptores AT₁, potencializam a consolidação da memória condicionada ao medo em ratos. Porém, a administração de Ang II intra-hipocampal impede a consolidação desta mesma memória, e este efeito é via receptores AT₂ (Kerr et al., 2005). Quanto à memória espacial, ratos submetidos ao tratamento crônico com inibidores da ECA melhoraram seu desempenho no labirinto aquático de Morris (Jenkins e Chai, 2007). Além disso, a administração de Angiotensina II ou (1-7) ou bloqueio de seus receptores é capaz de alterar parâmetros eletrofisiológicos (LTP e LTD) em regiões cerebrais como amígdala e hipocampo (Tchekalarova e Albrecht, 2006; Hellner et al., 2005; Armstrong et al., 1996; Kerr et al., 2004; Wayner et al., 1995). No entanto, pouco se sabe sobre a modulação da memória pelo eixo Ang-(1-7)/receptor Mas.

O estudo pioneiro de Walther et al. (1998) com animais nocautes para o receptor Mas mostrou que estes apresentavam disfunções comportamentais, como ansiedade elevada, e alterações eletrofisiológicas, apresentando LTP mais robusta em relação aos animais controle. No entanto, é importante frisar que o background genético utilizado neste estudo difere do utilizado em nosso trabalho, uma vez que dispomos de camundongos da linhagem FVBn, enquanto os trabalhos prévios utilizaram animais C57BL/6. Portanto, nossos dados são os primeiros a demonstrar déficit de memória em decorrência da ablação do gene Mas, quando o background utilizado é o FVBn.

Baseado nos resultados eletrofisiológicos que mostraram LTP mais robusta em animais C57/Bl6 nocautes para o receptor Mas (Walter et al., 1998) decidimos analisar inicialmente o desempenho dos camundongos FVBn MasKo na tarefa de esquiva inibitória. O aprendizado na esquiva inibitória envolve uma série de eventos bioquímicos no hipocampo que são necessários para a consolidação desta memória. Estes eventos são similares às várias vias que foram descritas como necessárias a diferentes tipos de potenciação de longo prazo (LTP) e outras formas de plasticidade neural (Baudry, Bi, e Tocco, 1996; Bliss e Collingridge, 1993; Collingridge e Bliss, 1993; Izquierdo e Medina, 1995, 1997; Maren e Baudry, 1995; Martin e Kandel, 1996; Reymann, 1993).

Basicamente, os eventos bioquímicos que participam da consolidação da memória na tarefa da esquiva inibitória envolvem a ativação de receptores glutamatérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos e

gabaérgicos hipocampais e envolvem diferentes cascatas de proteínas cinases: PKG, PKA, PKC e cálcio-calmodulina II (CaMKII) e ERK (Vianna et al., 2000 ; Izquierdo e Medina, 1997).

Essa maquinaria celular necessária para a formação deste tipo de memória sofre influência da modulação angiotensinérgica. Estudos mostram, por exemplo, que as cascatas geradas pela ativação de AT₁ pela Ang II, passam por componentes comuns à formação das memórias, como ERK, PKA, PKC, CREB, MAPK (Koka et al., 2008; Cammarota et al., 2001; Hayabuchi et al., 2001). Logo, se as angiotensinas são capazes de modular a atividade dos sinalizadores intracelulares envolvidos com a formação de memórias é plausível que disfunções do SRA alterem a aquisição ou consolidação da memória de esQUIVA inibitória.

No entanto, nossos resultados mostraram que os animais MasKo não possuem déficit na tarefa de esQUIVA inibitória. Isso nos indica que apesar da neuromodulação angiotensinérgica convergir com parte das vias de sinalização intracelular recrutada para a consolidação deste tipo de memória, a integridade destas vias foi aparentemente mantida mesmo com a depleção dos receptores Mas.

Sabendo que as memórias, bem como seus substratos neurais diferem e que o processamento destas memórias pode variar em complexidade, decidimos avaliar o desempenho dos animais MasKo em outros paradigmas comportamentais onde a modulação do eixo Ang-(1-7)/Mas poderia ser mais expressiva.

A memória de trabalho é uma memória de curtíssima duração, que não deixa traços e é essencial para a continuidade de tarefas ao longo da vida (McAfoose e Baune, 2009). Realizamos a tarefa do labirinto em Y para avaliar a memória de trabalho, utilizando como índice desta memória a porcentagem de alternância espontânea dos animais. Esta tarefa baseia-se na tendência dos roedores em alternar entre os braços do labirinto, sem que haja qualquer tipo de recompensa ou punição durante o experimento (Hughes, 2004).

Nossos resultados revelaram que os animais MasKo não possuem déficit na memória de trabalho, ou seja, são capazes de alternar entre braços recentemente visitados e dar prosseguimento a uma exploração lógica pelo ambiente. Logo, podemos concluir que a depleção do receptor Mas não afetou a expressão da memória de trabalho, quando a tarefa utilizada foi o labirinto em Y.

Ainda avaliamos a memória do tipo-declarativa, utilizando como paradigma comportamental o reconhecimento de objetos. Usamos esta tarefa simples para testar tanto o componente novidade, quanto o temporal e o espacial.

Nossos resultados mostraram que na tarefa de reconhecimento de objetos os animais MasKo possuem déficit nos três componentes avaliados, indicando que a integridade do eixo Ang-(1-7)/Mas é essencial para a expressão deste tipo de memória.

Estudos prévios sugerem que a depleção do receptor Mas não prejudica a memória espacial, porém os experimentos em questão utilizaram o background C57BL/6. Além disso, a tarefa utilizada para avaliar a memória espacial foi o labirinto aquático de Morris (Walther et al., 1998), que para ser consolidada requer multi-sessões de treino, além de possuir um componente naturalmente aversivo para roedores que é a água. Porém, em um estudo mais recente, os mesmos autores mostraram que fêmeas MasKo com background C57BL/6 possuem déficit de memória espacial quando testadas no labirinto aquático (Walther et al., 2000). Portanto, pelo menos com relação à interpretação dos resultados de memória espacial é preciso considerar a linhagem, o sexo e o protocolo utilizado. Aqui avaliamos camundongos machos, com background FVBn e utilizamos uma tarefa com aprendizado em um único treino e sem componente aversivo. Nossos resultados mostram que para a consolidação da memória espacial, nas condições experimentais acima descritas, a modulação do eixo Ang-(1-7)/Mas é essencial.

A memória do tipo episódica é um verdadeiro guia de experiências pessoais. Sem essa memória intacta padrões importantes das informações se perdem e a chance de erro de organizá-las de forma útil aumenta. Vale aqui ressaltar que a memória do tipo episódica é um análogo animal da memória declarativa e, segundo Brandão (2004) ela: “corresponde, efetivamente ao que todos entendem como memória, dado que corresponde a fatos informações adquiridos através da aprendizagem e que conscientemente acessamos através da busca aos arquivos de memória.”

Estudos com lesões ou bloqueios farmacológicos mostraram que os

componentes da memória do tipo episódica dependem de substratos neurais diferentes. Por exemplo, Balderas et al. (2008) mostrou que o hipocampo está muito mais envolvido com o contexto ambiental em que se encontra o objeto do que com a novidade deste objeto, o que fica mais cargo do processamento do córtex perirrinal. De qualquer forma, ter o lobo temporal intacto é fundamental para o processamento da memória do tipo episódica avaliada pela tarefa de reconhecimento de objetos.

O componente novidade da tarefa de reconhecimento de objetos permite avaliar as memórias de curta (MCD) e de longa duração (MLD). Nossos resultados mostraram que ambas MCD e MLD foram prejudicadas pela depleção genética do receptor Mas.

Na tarefa de RO, a inibição hipocampal da tradução do RNAm (Myskiw et al., 2008) ou da síntese protéica (Rossato et al., 2007) imediatamente ou 180 minutos após o treino prejudicou a consolidação da MLD, sem afetar a retenção da MCD. Logo, podemos inferir que a MLD necessita de síntese protéica, enquanto a MCD parece dispensar a síntese de novas proteínas para ser consolidada, o que faz com que o traço gerado pela MLD seja mais estável e duradouro.

A região CA1 hipocampal é uma região recrutada durante a tarefa de reconhecimento de objetos e um recente estudo demonstrou que esta região também está envolvida na tarefa de localização espacial de objetos (Assini et al., 2009). Hellner e colaboradores (2005) verificaram que animais MasKo apresentam LTP hipocampal aumentada e que a administração de Angiotensina-(1-7) sobre estas fatias bloqueia este efeito provavelmente via

ativação de receptores AT_1 , já que a administração de Losartan impede o efeito da Ang-(1-7). Estes resultados motivaram o estabelecimento da seguinte hipótese: a ausência de receptores Mas hipocampais causa um aumento na produção de Ang-(1-7), que em altas concentrações está ativando os receptores AT_1 e causando os déficits de memória encontrados.

Inicialmente, administramos os bloqueadores de receptores AT_1 e AT_2 , Losartan e PD123319, respectivamente. Essas drogas são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e bloquear funcionalmente seus receptores-alvo. Verificamos que o bloqueio dos receptores AT_2 pré-treino não afetou a memória de reconhecimento de objetos dos animais controles FVBn e não modificou o déficit de memória dos animais MasKo. No entanto, o bloqueio pré-treino dos receptores AT_1 reverteu o déficit de memória dos animais MasKo, sem ter tido efeito sobre a memória dos animais controles FVBn. Portanto, nossos resultados sugerem que os déficits encontrados nos animais MasKo se dá via ativação de receptores AT_1 . Apoiando nossos resultados está o fato de que a Ang-(1-7), comparada com a Ang II, é cerca de 150 vezes menos efetiva em ativar receptores AT_1 e cerca de 6000 vezes menos efetiva em ativar receptores AT_2 (Rowe et al. 1995). Além disso, para atuar sobre receptores AT_1 , a concentração de Ang-(1-7) necessária para alterar a indução de LTP foi altamente superior quando comparada à concentração de Ang II responsável pelo mesmo efeito (Hellner et al., 2005). Logo, duas possibilidades são possíveis: (1) a expressão de receptores AT_1 hipocampais está aumentada nos animais MasKo favorecendo então a ligação da Ang-(1-7) ou (2) os níveis de Ang-(1-7) estão aumentados no hipocampo dos animais MasKo.

Apesar de haver um efeito regulatório do receptor Mas sobre o receptor AT₁, uma vez que o primeiro é capaz de diminuir a disponibilidade deste último na superfície celular por um mecanismo oligomérico (Kostenis et al., 2005, und Halbach e Albrecht, 2000), a expressão destes receptores no cérebro de animais MasKo não difere dos animais controle (Walther et al., 1998 ; und Halbach et al., 2000). Logo, a segunda possibilidade parece ser a mais provável.

De fato, nossos resultados com radioimunoensaio mostraram que a Angiotensina-(1-7) hipocampal dos animais nocaute encontra-se 10 vezes mais elevada em relação aos animais controle. Chappell (1989) mostrou por RIE que, em ratos, as angiotensinas hipocampais predominantes são a Ang I, Ang II e Ang-(1-7), não havendo diferença com relação aos níveis de cada uma. Logo, nossos resultados sugerem que a depleção do receptor Mas, especificamente no hipocampo, favoreceu o acúmulo de Ang-(1-7).

Com base nestes resultados, podemos especular que as altas concentrações de Ang-(1-7) observadas no hipocampo dos animais MasKo podem ser decorrentes de um aumento na atividade e/ou expressão de enzimas que sintetizam a Ang-(1-7), como a ECA2, NEP , TOP e POP (Trask e Ferrario, 2007). Ainda, como os níveis de Ang II não diferiram entre os genótipos, podemos sugerir que provavelmente a principal fonte deste excesso de Ang-(1-7) hipocampal é proveniente da degradação de Ang II pela ECA2.

Um dado bastante interessante foi o de termos encontrado um déficit de memória cuja procedência, ao que tudo indica, vem da ativação dos

receptores AT₁. Apesar dos dados da literatura mostrarem efeitos amnésicos da Ang II via ativação de receptores AT₂, e não AT₁ (Kerr et al. , 2004 ; Bonini et al., 2006), a tarefa utilizada foi a esQUIVA inibitória. Aqui, mostramos pela primeira vez que não há alteração na memória de reconhecimento de objetos após a administração pré-treino de antagonistas de receptores AT₁ ou AT₂. E ainda, que a ausência de receptores Mas favorece a ativação dos receptores AT₁.

Assumindo que a ativação de receptores AT₁ pela Ang-(1-7) é o responsável pelo déficit de memória encontrado nos camundongos MasKo podemos sugerir alguns dos mecanismos moleculares que poderiam estar sendo desencadeados após esta ativação.

Estudos mostraram que a ativação do receptor Mas é capaz de induzir a síntese de NO (Sampaio, 2007; Brosnihan, 1998) e que este tem efeitos importantes sobre a fisiologia do tônus vascular (Lemos et al., 2005). Estudos de Medina e Izquierdo (1995) sugerem que o NO, sintetizado nos neurônios pela nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), atua como um neurotransmissor retrógrado, capaz de facilitar tanto a formação das memórias como a LTP. Outros estudos ainda provaram que o bloqueio da síntese de NO é capaz de prejudicar memórias (Baratti 1996 e 2009; Izquierdo et al., 2006).

A figura 19 ilustra as principais vias intracelulares mediadas pelas angiotensinas no neurônio. Ressalte-se aqui o papel do NO, que além de ser um potente neuromodulador da memória, é um ponto de convergência entre as vias ativadas pelos receptores AT₁ e Mas. A ativação do receptor Mas,

7. CONCLUSÕES

- Os camundongos MasKo não apresentam déficit de memória na tarefa de esquiva inibitória;
- Os camundongos MasKo não apresentam déficit de memória de trabalho avaliada no labirinto em Y;
- Os camundongos MasKo apresentam déficit de memória de reconhecimento de objeto, em todos os componentes avaliados, novidade, espacial temporal;
- O déficit de memória de reconhecimento de memória dos camundongos MasKo é revertido pelo bloqueio de receptores AT₁, mas não receptores AT₂;
- O hipocampo de camundongos MasKo apresenta 10x mais Ang-(1-7) quando comparado com hipocampo de animais FVBn, não havendo diferença nos níveis de Ang II.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alenina, N. et al. Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem Cytochem*, v.50, n.5: p.691-6, May 2002.
2. Alenina, N. et al. Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1–7). *Experimental Physiology*. 2007. vol 92. Issue 7.
3. Ambroz, C et al. The Mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochim Biophys Acta*, v.1133: p.107-111, 1991.
4. Ardenghi, P. et al. Late and prolonged memory modulation in entorhinal and parietal cortex by drugs acting on the cAMP/protein kinase A signaling pathway. *Behav Pharmacol*, 1997, 8: 745-751
5. Baddeley, A. D. The episodic buffer: a new component for working memory? *Trends in Cognitive Sciences*, (2000). 4, 417–423.
6. Bader, M. Ganten, D. Update on tissue rennin-angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine*, 2008.
7. Baltatu, O. Bader, M. Ganten, D. Angiotensin. *Encyclopedia of Stress*. Fink G Ed. New York, NY: Academic Press. 2000, PP. 195-199.
8. Baratti CM, Kopf SR. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiol Learn Mem* 1996; 65: 197-201.

9. Baratti, C.M. et al. Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. *Braz J Med Biol Res* 42(2) 2009
10. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA; Neurociências: desvendando o sistema nervoso; coord. trad. Jorge Alberto Quillfeldt – 2 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2002, 517: 739-773.
11. Berne, RM. Fisiologia. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2004, 1082p.
12. Bianchin, M. et al. The amígdala is involved in the modulation of long-term memory but not in working or short-term memory. *Neurobiol Learning Memory*, 1999, 71:127-31
13. Bliss TPV & Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature (London)* 361: 31-39.
14. Bonini, JS. et al. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Hormones and Behavior*. 50 (2006). 308-313.
15. Botelho, LMO. et al. Plasma Angiotensin-(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides*, v.15;4: pp.723-729,1994.

16. Brandão, ML. As bases biológicas do comportamento. Ed. EPU, São Paulo, 2004, 223p.
17. Braun-Menendez, E. et al. The substance causing renal hypertension. *J Physiol*, v.98: p.283-298, 1940.
18. Brosnihan KB. Effect of the Angiotensin-(1-7) peptide on nitric oxide release. *Am J Cardiol*. 1998 Nov 19;82(10A):17S-19S.
19. Brosnihan, BK. et al. Biotransformation of angiotensins in the central nervous system. *Therapeutic Research*, vol 9:184-195, 1988.
20. Brown K. Angiotensin receptors are implicated in the mechanism of mas action. *Trends Pharmacol Sci* ,1989, 10:87–89
21. Buitrago, S. et al. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2008 Jan;47(1):11-7.
22. Bunnemann, B. et al. Autoradiographic localization of Mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience Letters*, v114: p.147-153, 1990.

23. Cammarota M, et al. Angiotensin II promotes the phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) at Ser133 through an ERK1/2-dependent mechanism. *J Neurochem.* 2001 Dec;79(6):1122-8.
24. Campagnole-Santos, MJ. et al. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am. Journal Physiol.* 263(1): R89-94, 1992.
25. Capettini, SB. Memória e aprendizado em fêmeas deficientes do transportador vesicular de acetilcolina. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009, 140p.
26. Castro, BM et al. Reduced expression of the vesicular Acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes, Brain and Behavior.* (2009) 8: 23–35.
27. Chappell MC et al. . Identification of Angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem.* 1989 Oct 5;264(28):16518-23.
28. Clayton, NS et al. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, 1998, 395, 272-4
29. Costa, A.P.R. et al. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. *Endocrinology*, v.144: p.1942-1948, 2003.

30. Cowan, N. An embedded-processes model of working memory. In A. Miyake, & P. Shah (Eds.), *Models of working memory: Mechanisms of active maintenance and executive control* (1999, pp. 62–101).
31. Daemen, MJ. et al. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circulation Research*. 1991, 68:450-56
32. Dere, E. et al. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain research protocols*. 2005, 16:10-19
33. Dere, E. et al. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 31 (2007) 673-704.
34. Diz DI, et al. Angiotensin-(1-7) and baroreflex function in nucleus tractus solitarii of (mRen2)²⁷ transgenic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Jun;51(6):542-8.
35. Donadio MV, et al. Angiotensin II receptors in the arcuate nucleus mediate stress-induced reduction of prolactin secretion in steroid-primed ovariectomized and lactating rats. *Brain Res*. 2004 Apr 23;1006(1):59-65.

36. Donoghue, M. et al. A novel angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin-(1-9). *Circ Res*, v.87: p.E1-E9, 2000.
37. Doobay, MF. et al. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain rennin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007,292: R373-R381
38. Ennaceur, A e Delacour, J., A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I. Behavioral data, *Behavioural Brain Research* 31 (1988), pp. 47–59.
39. Ferrario, C.M. Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*, v.47:p.515-521, 2006.
40. Ferrario, C.M. et al. Counterregulatory actions of Angiotensin-(1-7). *Hypertension*, v.30: p.535-541, 1997.
41. Ferrario, C.M. et al. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function and natriuresis. *J Am Soc Nephrol*, v.9: p.1716–1722, 1998.

42. Ferrario, C.M.; IYER, S.N. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the reninangiotensin system. *Regul Peptides*, v.78, n.1: pp.13-18(6), Nov 1998.
43. Ferrario, CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006 Mar;7(1):3-14.
44. Ferreira A.J., Santos R.A.S. Cardiovascular actions of Angiotensin-(1-7). *Braz. J. Méd. Biol. Res.* 38(4): 499-507, 2005.
45. Fontes, M.A.P. et al. Evidence that Angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventrolateral medulla acting through specific receptors. *Brain Res*, v.665: p.175-180, 1994
46. Freeman, E.J. et al. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*, v.28: p.104-108, 1996.
47. Genest J. Angiotensin, aldosterone and human arterial hypertension. *Can Med Assoc J.* 1961 Feb 25;84:403-19
48. Gerlai R. Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behav Brain Res.* 2001 Nov 1;125(1-2):269-77.

49. Giani, JF et al. Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart *in vivo*: role of the AT₁ and Mas receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Aug;293(2):H1154-63. Epub 2007 May 11.
50. Gironacci,MM. et al. Angiotensin-(1–7) binds at the type 1 angiotensin II receptors in rat renal cortex. *Regulatory Peptides*, Volume 84, Issues 1-3, 22 October 1999, Pages 51-54
51. Gold, P. E. (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology*, 46, 87–98.
52. Haas E, Goldblatt H. Renin content of kidneys in experimental renal and human essential hypertension. *Am J Physiol*. 1959 Nov;197:1103-6
53. Hajjar, IM. et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors and cognitive and functional decline in patients with Alzheimer’s disease: an observational study. *Am J Alzheimer D and other Dementias*. 2008. 23:77-83.
54. Hanley, M.R. et al. The Mas oncogene as a neural peptide receptor: expression, regulation, and mechanism of action. *Ciba Foundation Symposiums*, v.150: p.23-46, 1990.

55. Hayabuchi Y et al. Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C. *J Physiol*. 2001 Jan 15;530(Pt 2):193-205.
56. Hellner, K. et al. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 29 (2005) 427 – 435
57. Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 Sep;28(5):497-505.
58. Iusuf D, et al. Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol*. 2008 May 13;585(2-3):303-12. Epub 2008 Mar 15.
59. Izquierdo I, et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory, *Behavioural Brain Research* 1999, 103: 1-11.
60. Izquierdo I, et al. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brains. *Neurobiological Learning Memory*. 1998; 69:219-24

61. Izquierdo LA, et al. Molecular Pharmacological Dissection of Short- and Long-Term Memory; Cellular and Molecular Neurobiology, Review; 2002, 22-34
62. Izquierdo, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. TRENDS in Neurosciences 2006 Vol.29 No.9
63. Izquierdo, I. McGaugh JL. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation; 2000, 11(7-8):517-34
64. Izquierdo, I. Memória; Artmed editora S/A; 2002; p 9-57.
65. Jackson, T.R. et al. The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. Nature, v.335: p.437-440, 1988.
66. Jackson, T.R. et al. The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. Nature, v.335: p.437-440, 1988.
67. Jenkins, TA. Chai, SY. Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on spatial memory and anxiety-like behaviours in rats. Neurobiology of Learning and Memory. 2007. 87:218-224.

68. Kane, M. J. et al. The generality of working memory capacity: a latent-variable approach to verbal and visuospatial memory span and reasoning. *Journal of Experimental Psychology*, 2004, 133(3), 189–217.
69. Karl, T et al. Behavioural profile of a new mouse model for NPY deficiency *European Journal of Neuroscience*, Vol. 28, pp. 173–180, 2008
70. Kerr, DS. et al. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT_2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology*. 2005. 179:529-535.
71. Koka V et al. Angiotensin II up-regulates angiotensin I-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT_1 -ERK/p38 MAP kinase pathway. *Am J Pathol*. 2008 May;172(5):1174-83. Epub 2008 Apr 10.
72. Kostenis, E. et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, v.111: p.1806–1813, 2005.
73. Lemos VS, et al. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1–7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 46:274–279
74. Lent, R. *Neurociência da Mente e do Comportamento*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008, 356p.

75. Lindpainter, K. Ganten, D. Tissue renin-angiotensin systems and their modulation: the heart as a paradigm for new aspects of converting enzyme inhibition. *Cardiology* vol 9 (suppl.1): 32-44, 1991.
76. Lu, J. et al. Angiotensin IV enhances phosphorylation of 4EBP1 by multiple signaling events in lung endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2005 Jul;275(1-2):181-8.
77. Machado, R.D.P. et al. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci*, v.66: p.67-76, 1999.
78. Macova, Miroslava. Pavel, Jaroslav. Saavedra, Juan M. A peripherally administered, centrally acting angiotensin II AT₂ antagonist selectively increases brain AT₁ receptors and decreases brain tyrosine hydroxylase transcription, pituitary vasopressin and ACTH. *Brain Research.* 2009, 130-140
79. McAfoose J, Baune BT. Exploring visual-spatial working memory: a critical review of concepts and models. *Neuropsychol Rev.* 2009 Mar;19(1):130-42. Epub 2008 Sep 24.
80. McGaugh, JL. Memory, a Century of Consolidation, *Science*, 2000, 287: 248-253.

81. Mendes, ACR. Efeito da infusão crônica de Angiotensina-(1-7) e de seu antagonista seletivo d-ala7-Ang-(1-7), A779, sobre o perfil plasmático e tecidual de angiotensinas em ratos. Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 114p.
82. Messier, C. et al. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1999, 63:313-318.
83. Metzger, R. et al. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *PEBS Letters*. 1995, 357:27-32
84. Miyake, A. et al. How are visuospatial working memory, executive functioning and spatial abilities related? A latent-variable analysis. *Journal of Experimental Psychology*, 2000, 130(4), 621–540.
85. Oliveira, HP et al. Eutanásia em medicina veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2002. Disponível em: <http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=26>
86. Pan, HL. Brain angiotensin II and synaptic transmission. *Neuroscientist*. 2004, 10(5):422-31.
87. Pastalkova et al. 2006. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*. 2006. 313(5790):1141-4

88. Paton JF. Et al. . Adenoviral vector demonstrates that angiotensin II-induced depression of the cardiac baroreflex is mediated by endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol*. 2001 Mar 1;531(Pt 2):445-58.
89. Pereira, V. et al. Immunolocalization of Angiotensin-(1-7)/Mas receptor and angiotensin II in the rat ovary. *The society for the study of reproduction 38th Annual Meeting*: p.24-27, Quebec City, Quebec, Canada, July 2005.
90. Phillips MI, et al. .Brain angiotensin and the female reproductive cycle. *Adv Exp Med Biol*. 1995;377:357-70.
91. Phillips, MI. Oliveira, EM. Brain renin angiotensin in disease. *Journal of Molecular Medicine*. 2008.
92. Polidori, C. et al. Functional evidence for the ability of angiotensin AT₁ receptor antagonists to cross the blood-brain barrier in rats. *Europeans Journal of Pharmacology*. 1996. 307:259-267.
93. Prado VF, et al. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in social recognition. *Neuron*: 51: 601-612, 2006.

94. Ptasinska-Wnuk D. et al. Angiotensins II and IV stimulate the rat anterior pituitary cell proliferation independently of the AT₁ receptor subtype. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003 Dec;24(6):397-400.
95. Pych JC, Chang Q, Colon-Riviera C, Gold PE (2005) Acetylcholine release in hippocampus and striatum during testing on a rewarded spontaneous alternation task. *Neurobiol Learn Mem* 84: 93-101.
96. Raghavendra, V. Chopra, K. Kulkarni, SK. Comparative studies on the memory-enhancing actions of captopril and Losartan in mice using inhibitory shock avoidance paradigm. *Neuropeptides.*2001. 35:65-69
97. Rossato JI, et al. A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. *An Acad Bras Cienc.* 2006 Sep;78(3):515-23.
98. Rowe et al., Angiotensin-(1–7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain, *Regul. Pept.* 56 (1995), pp. 139–146
99. Sampaio WO, et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension.* 2007 Jan;49(1):185-92. Epub 2006 Nov 20.

100. Sánchez-Lemus E, et al. *In vivo* Angiotensin II AT(1) receptor blockade selectively inhibits LPS-induced innate immune response and ACTH release in rat pituitary gland. *Brain Behav Immun*. 2009 May 7.
101. Santos, RAS et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for a G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 2003 vol 100. n 14: 8258-63
102. Saxby, BK, et al. Candesartan and cognitive decline in older patients with hypertension: a substudy of the SCOPE trial. *Neurology*. 2008, 70(19 Pt 2):1858-66
103. Siejka, A. et al. . Angiotensins II and IV modulate adrenocortical cell proliferation in ovariectomized rats. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Sep;57(3):451-61.
104. Simões e Silva, A.C. et al. The renin angiotensin system in childhood hypertension: selective increase of Angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J Pediatr*, v.145, n.1: p.93-8, Jul 2004.
105. Skeggs, LT. Kahn, JR. Shumway, NP. Preparation and function of the hypertensive converting-enzyme. *Exp. Med*. Vol 103 : 295, 1956.
106. Squire, LR e Kandel, ER. *Memória - Da mente às moléculas*. Artmed Ed., Porto Alegre, 2003, 251p.

107. Starchina YA, et al. Cognitive function and the emotional state of stroke patients on antihypertensive therapy. *Neurosci Behav Physiol*. 2007, 37(1):13-7.
108. Strawn, WB. et al. Angiotensin(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension*. 1999, 33:207-211
109. Su EJ, et al. Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension*. 1998, 31:1331-1337
110. Suzuki, WA. Clayton, NS. The hippocampus and memory: a comparative and ethological perspective. *Neurobiology of Behaviour*. 2000. 10:768-773.
111. Tallant, EA. et al. Angiotensin(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *American J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005. 289:1560-1566
112. Tchekalarova, J. Albrecht, D. Angiotensin II suppresses long-term depression in the lateral maygdala of mice via L-type calcion channels. *Neuroscience Letteres*. 2007. 415:68-72.

113. Tigerstedt, R.; Bergman, P.G. Niere und Kreislauf. *Scandinav Arch J Physiol*, v.8: p.223, 1898.
114. Tipnis, S.R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, v.275: p.33238-33243, 2000.
115. Trask, AJ. Ferrario, CM. Angiotensin-(1-7): Pharmacology and New Perspectives in Cardiovascular Treatments. *Cardiovascular Drug Reviews*. Vol. 25, No. 2, pp. 162–174
116. Tulving, E. Episodic and semantic memory. In: Tulving E, Donaldson W, editors. *Organization of memory*. New York: Academic Press, 1972: 381-403.
117. und Halbach, O B. Albrecht, D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* (2006) 326: 599–616
118. und Halbach, OB. et al. Interaction between Mas and angiotensin AT₁ receptor , in the amygdale. *Journal of Neurophysiology* 2000. 83(4):2012-21.
119. Velloso, EPP. Alterações do sistema renina-angiotensina plasmático em pacientes com doença hipertensiva específica da gravidez. Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.105p.

120. Vianna, MRM, et al. Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short-from long-term memory; *Behav. Pharmacol.* 1999, 10(2):223-7
121. Vickers, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*, v.277: p.14838- 14843, 2002.
122. Wackenfors A. et al. Angiotensin II receptor mRNA expression and vasoconstriction in human coronary arteries: effects of heart failure and age. *Basic Clin. Pharmacology and Toxicology.* 2004. 95:266-272.
123. Walther T, et al. Sex specific behavioural alterations in Mas-deficient mice. *Behav Brain*, 2000, Res 107:105–109
124. Walther, T. et al. Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. *Behavioural Brain Research.* 100 (1999) 1-4.
125. Walther, T. et al. Sustained Long Term Potentiation and Anxiety in Mice Lacking the Mas Protooncogene. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 273, No. 19, Issue of May 8, pp. 11867–11873, 1998
126. Wan, H et al. Different contributions of the hippocampus and perihinal cortex to recognition memory. *The Journal of neuroscience*, 1999. 19(3):1142-1148.

127. Wang, JM. Central Nervous system blockade by peripheral administration of AT₁ receptor blockers. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2003. 41(4):593-99.
128. Whitlock, JR et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006. 313:1093-97
129. Young, D. et al. Characterization of the rat Mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.85, n.14: p.5339-5342, Jul 1988.
130. Young, D. et al. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*, v.45: p.711-719, 1986.
131. Xia H, Lazartigues E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *J Neurochem*. 2008 Dec;107(6):1482-94. Epub 2008 Nov 5.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)