

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**

**PROJETO DE PESQUISA**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES B<sub>1</sub> E B<sub>2</sub> NO DESENVOLVIMENTO  
CEREBRAL DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À ANÓXIA NEONATAL**

Projeto de Iniciação Científica submetido para avaliação no Edital: 04/2022

Modalidade: voluntário

**SÃO BERNARDO DO CAMPO**

**2022**

## RESUMO

**Introdução:** Componentes do sistema caliceína-cinina estão presentes no cérebro normal em baixas concentrações, a qual pode aumentar dramaticamente durante insultos cerebrais tais como isquemia/reperfusão. Mediadores inflamatórios específicos produzidos no local da lesão podem regular a resposta vascular desta área. Um destes mediadores é a bradicinina, que aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica para pequenas moléculas por ação no receptor B2 e no receptor B1, levando a efeitos pró-inflamatórios. **Objetivo:** O presente estudo tem o objetivo de verificar as alterações cerebrais nos níveis de expressão das proteínas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e de seus respectivos receptores em ratos *Wistar* submetidos à anóxia neonatal. **Métodos:** Os ratos neonatos com 1 a 2 dias de vida pós-natal (PN1-2), serão submetidos ao modelo descrito por Takada e colaboradores (Takada *et al.*, 2011) onde serão colocados em uma câmara de polycarbonato, a qual será saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 11,5 L/minuto, durante 25 minutos e aquecidos a 37°C. O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecerá ao ar ambiente. Os encéfalos dos filhotes machos serão dissecados com PN7 e encaminhados para o estudo de imunohistoquímica, imunofluorescência e RT-PCR para análise das proteínas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e seus receptores. Todos os dados obtidos neste estudo resultarão em contribuições científicas relevantes para a compreensão dos reais efeitos da anóxia sobre o desenvolvimento cerebral dos filhotes.

**Palavras-chave:** anóxia, vascularização, desenvolvimento, neuroproteção.

**Área do conhecimento do projeto:** Doenças do neurodesenvolvimento.

## 1. INTRODUÇÃO

Está bem elucidado que a inflamação é uma resposta biológica normal a uma injúria tecidual, e que atualmente é caracterizada pela ativação de inúmeros mediadores e tipos celulares.

Os mediadores químicos que são produzidos durante a inflamação são as aminas vasoativas: histamina e serotonina (5-HT); proteases do plasma: sistema complemento; sistema de cinina: Bradicinina; sistema de coagulação: Trombina e Fator Xa; metabólitos do ácido araquidônico: prostaglandinas (PG), prostaglandina E (PGE), tromboxano A<sub>2</sub>, leucotrieno (LT); PAF – fator ativador de plaquetas; citocinas; interleucinas; quimocinas; óxido nítrico e constituintes lisossômicos dos leucócitos (ex. grânulos azurófilos e específicos dos neutrófilos) (Waltrick, 2004).

Tal ativação resulta em um aumento do fluxo sanguíneo assim como da permeabilidade dos vasos sanguíneos, promovendo então, o movimento de células específicas para o interior da área lesada (Bhoola, 1996). Mediadores inflamatórios específicos produzidos no local da lesão regulam, por exemplo, a resposta vascular desta área. Entre estes mediadores podemos citar moléculas vasoativas que atuam diretamente sobre o epitélio vascular na tentativa de aumentar a permeabilidade vascular. A bradicinina e o peptídeo intimamente relacionado calidina são peptídeos vasoativos formados pela ação de enzimas sobre substratos protéicos denominados cininogênios (Rubin e Farber, 1990, Dale et al., 1994)

Componentes do sistema calicreína-cinina estão presentes no cérebro normal em baixas concentrações, a qual pode aumentar dramaticamente durante

insultos cerebral tais como isquemia/reperfusão (Wahl et al., 1988). Estudos in vitro têm demonstrado que a bradicinina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica para pequenas moléculas por ação no receptor B2 (Unterberg et al., 1984). Os receptores B2, considerados receptores clássicos das cininas, medeiam à maioria das respostas biológicas induzidas pela bradicinina incluindo broncoconstrição, hipotensão, resposta inflamatória aguda, dor e hiperalgesia e estão presentes em vários tecidos (Steranka e Burch, 1991; Hall, 1997; Dray e Perkins, 1993), já os receptores B1 podem ativar indiretamente fibras aferentes sensoriais C através da liberação de prostaglandinas (Dray e Perkins, 1993), mastócitos (McLean et al., 2000) e citocinas, especialmente interleucina 1 (Perretti et al., 1993; Ahluwalia e Perretti, 1994). Os efeitos pró-inflamatórios dos receptores B1 incluem promoção do tráfico de leucócitos, edema e dor (Couture et al., 2001).

Compreender a participação destes peptídeos e suas respectivas funções após um insulto torna-se essencial para criar mecanismos que possibilitem o entendimento, assim como a recuperação de áreas lesadas após a anóxia cerebral.

## **2. OBJETIVO**

Investigar a participação das proteínas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e de seus respectivos receptores em regiões cerebrais de ratos *Wistar* submetidos ao modelo de anóxia neonatal.

### 2.1. Objetivo específico:

- Avaliar expressão do RNAm e das proteínas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nas regiões do hipocampo e córtex, mediante as técnicas de Imuno-histoquímica, Imunofluorescência e RT-PCR.

## 3. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Em 12 meses	Realização das atividades a serem desenvolvidas.
-1° ao 3° mês	Formação de todos os grupos que serão estudados
-4° ao 6° mês	Análise proteica por imuno-histoquímica, imunofluorescência e RT-PCR
-7° ao 9° mês	Análise dos dados e relatórios
-10° mês 12° mês	Execução do artigo relacionado ao estudo

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Serão utilizadas ratas fêmeas da linhagem *Wistar*, virgens, pesando entre 200 e 250g, fornecidas pelo Biotério da Universidade Federal do ABC - câmpus São Bernardo do Campo. Durante todo o experimento esses animais terão acesso livre a água e ração e permanecerão em ciclo claro-escuro de 12 horas (7-19 horas) a uma temperatura constante de 22-24°C. Os procedimentos descritos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e que serão aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC.

#### **4.2 Verificação do Ciclo Estral**

Todas as ratas serão submetidas à análise do padrão do ciclo estral através do estudo colpocitológico do esfregaço vaginal que será realizado diariamente entre 8:00 e 10:00 da manhã. Cada fase do ciclo estral é facilmente determinada pela análise do tipo de células que descama do epitélio vaginal, tecido altamente responsivo ao estradiol e progesterona.

O conteúdo vaginal será coletado por meio de conta-gotas atraumático, com solução salina e observado em microscópio comum. Apenas as ratas que apresentarem ciclo estral regular com o aparecimento da fase de estro a intervalos de 3 a 4 dias serão acasaladas e acompanhadas durante todo período gestacional.

#### **4.3 Acasalamento e confirmação da prenhez**

O esfregaço vaginal será realizado pela manhã, após o acasalamento; a confirmação da prenhez será verificada pela presença de espermatozoides no epitélio vaginal da rata quando analisado em microscópio óptico. A constatação de espermatozoides determinará o início da prenhez (dia zero) e a retirada do macho da gaiola.

#### **4.4 Formação dos grupos**

O estudo será desenvolvido apenas com filhotes machos com a finalidade de se obterem menor variabilidade dos dados, sem o possível condicionamento de aspectos hormonais inerentes ao sexo. Para o estudo serão necessário um número de 5 filhotes para o grupo experimental e 5 filhotes para o grupo controle.

#### **4.5 Anóxia Neonatal**

Utilizaremos a adaptação do modelo de anóxia neonatal previamente padronizado e validado em ratos com 1 a 2 dias de vida (Takada *et al.*, 2011), idade cujo desenvolvimento encefálico corresponde a um prematuro humano (Semple *et al.*, 2013). As vantagens deste modelo em relação aos demais, são que ele permite a asfixia global, não invasiva, provocando hipoxemia e hipercapnia similar à condição da anóxia neonatal em humanos (Takada *et al.*, 2011). Além disso, promove morte celular em estruturas susceptíveis, como o hipocampo, com posterior diminuição de volume desta estrutura e da neurogênese hipocampal, resultando em déficits de memória de referência espacial, aprendizagem e déficits na memória operacional, com aumento da ansiedade (Takada *et al.*, 2015a, Takada *et al.*, 2015b).

Deste modo, os neonatos com 1 a 2 dias de vida (PN1-2), pesando de 6 a 8g, serão colocados em uma câmara de policarbonato, a qual será saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 11,5L/minuto, durante 25 minutos e aquecidos a 37°C (Takada *et al.*, 2011). Após a recuperação dos animais (recuperação da coloração, da respiração e da movimentação ativa), eles

serão devolvidos para a mãe e após dois dias, ou seja, com (PN7) serão decapitados e seus encéfalos removidos para análises.

O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecerá ao ar ambiente.

#### **4.6 Análise Proteica: Imuno-histoquímica**

Os encéfalos serão removidos e fixados em solução Carnoy (60% etanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético) por um período de duas horas. Na sequência, os tecidos serão colocados em álcool, xilol e banhados em parafina, sendo posteriormente emblocados. Os cortes serão feitos no micrótomo com uma espessura de 10 µm e fixados em lâminas silanizadas. Para o início da imuno-histoquímica os cortes serão desparafinizados e em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% durante 15 minutos, será efetuado. Os cortes serão lavados com água destilada e submetidos à recuperação antigênica, onde as lâminas serão incubadas em tampão Tris-HCl (50mM pH 9,5), no micro-ondas, na potência máxima (700 Watts), durante um período de 7 minutos. Na sequência, as lâminas serão incubadas em um tampão Tris-Glicina (0,1 glicina, pH 7,4), durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguido de bloqueio com uma solução contendo 20mM tampão fosfato de sódio, pH 7,4; 0,45M NaCl; 0,3% Triton X-100 e albumina 5% por 90 minutos à temperatura ambiente.

Os cortes serão incubados por 48 horas com o anticorpo policlonal primário anti-B1 (1:100 - J.L. Bascands from France) e com o anticorpo monoclonal anti-B2



(1:100 – Transduction Laboratory - Lexington, KY, USA) diluído em albumina 2%. Após o período de incubação, as fatias serão lavadas com PBS (3x5 min) e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit (IgG, Heavy and Light Chain, Biotin Conjugate) (1:200, Calbiochem) diluído em albumina 2% por 90 minutos. Passado o tempo de incubação do anticorpo secundário, as fatias serão lavadas com PBS (3x5 min) e incubadas por 90 minutos em estreptavidina peroxidase – Kit ABC (Vector). O complexo antígeno-anticorpo será revelado com DAB, contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\mu\text{l}/\text{mL}$ . A seguir, os cortes serão desidratados e cobertos com lamínula. A marcação analisada em microscopia óptica.

#### **4.7 Imunofluorescência**

Para verificar se os receptores de cinina B1 e B2 serão localizados nos neurônios próximos da membrana nuclear ou inseridos na membrana plasmática do hipocampo, utilizaremos um protocolo de imunofluorescência em combinação com o marcador neuronal (Neu-N). O Neu-N é uma proteína encontrada nos núcleos das células. O primeiro anticorpo primário empregado será o anti-B1 de coelho (anticorpo policlonal), seguido pelo anticorpo anti-núcleo neuronal (Neu-N) (anticorpo monoclonal da Chemicon Internacional, Temecula, CA). Assim, um procedimento de dupla marcação de fluorescência será usado para rotular o receptor de cinina B1 mais a proteína Neu-N. O mesmo protocolo será realizado empregando receptor anti-B1 e receptor anti-B2 (anticorpo monoclonal) como anticorpos primários para co-localizar os receptores de cininas B1 e B2 nos neurônios.

Os animais serão mortos por perfusão transcardíaca. Os cérebros serão removidos do crânio, fixados por 30 minutos com paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M e crioprotetidos durante a noite em sacarose 30% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (PBS, pH 7,4) a 4 °C. Os cérebros serão seccionados em uma espessura de 10 µm em um micrótomo de faca deslizante e montados em lâminas Silane-Prepk (Sigma) e armazenados a -20 °C.

Após seis lavagens em tampão PBS, os cortes serão incubados por 30 min em PBS contendo 0,1 M de glicina para extinguir os grupos aldeídos que não reagirão. Em seguida, as seções serão lavadas seis vezes em PBS e incubadas com PBS contendo 0,01% de saponina (Calbiochem, Bioscience, La Jolla, CA) (PBS-saponina) e albumina sérica bovina 1% (bloqueando buffer) por 1 h para evitar a coloração de fundo. As fatias serão incubadas durante a noite com o primeiro anti-Anticorpo policlonal B1, diluído (1:100) em tampão de bloqueio. As seções serão lavadas em PBS-saponina e incubadas durante a noite com o segundo rato primário anti-Neu-Nanticorpo monoclonal, diluído (1:200) em tampão de bloqueio. As seções serão lavadas em PBS-saponina e incubadas sequencialmente em PBS contendo o anticorpo anti-coelho acoplado a Alexa Fluor 594 (vermelho) (1:300) por 1 h. Seguindo várias lavagens em PBS, os cortes serão incubados em PBS contendo o anticorpo anti-camundongo acoplado a Alexa Fluor 488 (verde) (1:300) (Molecular Probe, Eugene, OR) por 1 h. As seções serão lavadas em PBS e cobertas com lamínula com Fluoromount-G (Electronic Microscopy Science, Fort Washington). Diferentes imagens de ampliação serão obtidas.

#### 4.7 RT-PCR

Os tecidos congelados serão homogeneizados em 1 mL de reagente Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, EUA) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power Gen GENERATOR, Fisher Scientific, Alemanha). O isolamento do RNA total foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após homogeneização, 200 µl de clorofórmio foram adicionados ao homogenato e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos. Em seguida, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos e então, centrifugada por 12000 g, 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo estéril e 500 µl de isopropanol adicionado para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e novamente centrifugadas 12000 g , 10 minutos a 4 °C.

Os sobrenadantes foram retirados e os *pellets* de RNA, lavados com etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,01% e novamente centrifugados 12000 g, 5 minutos, a 4 °C, tendo os sobrenadantes sido descartados. Os *pellets* secaram ao ar livre, sendo, então, ressuspensos com 30 µl de água DEPC. Os RNAs obtidos serão quantificados em espectrofotômetro (Eppendorf) com leitura em filtro de 260 nm. A integridade dos RNAs será avaliada em eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. As amostras que apresentaram integridade das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal serão consideradas íntegras e utilizadas nos experimentos de quantificação de expressão gênica.

Para a quantificação da expressão do RNAm, serão utilizados os RNAs totais extraídos dos hipocampus e córtices. Para a eliminação da contaminação do DNA genômico das amostras, 1µg de RNA total será incubado com 1 unidade de *DNAse I/Rnase Free* (Invitrogen, EUA), 0,5 unidade de *RNAse OUT* (Invitrogen, EUA), 0,5 µl de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) (50 mM) e água DEPC, em uma reação de 13,5 µl. As amostras serão incubadas a 37 °C por 15 min e a 95 °C por 5 min, para inativação da DNaseI. Logo após o tratamento descrito, será realizada a reação da transcrição reversa (RT) para síntese do cDNA. Ao RNA tratado, serão adicionados 2,0 µl de tampão de (cloreto de potássio (KCl) 50 mM, Tris-HCL pH 8,4, 20 mM e  $MgCl_2$  2,5 mM), 1,0 unidade de transcriptase reversa MULV-RT (Invitrogen, EUA), 0,5 unidade de Rnase-OUT (Invitrogen, EUA), 1,0 µl de dideoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dNTPs, 10 mM, Amersham Biosciences, EUA), 50 ng de uma mistura de iniciadores (Random Hexamer Primer, RH, Amersham Biosciences, EUA) e 1,0 µl de ditioneitol (DTT), 10 mM em uma reação de 200 µl. As amostras serão, então, submetidas às seguintes incubações: 20 °C por 10 min, 42 °C por 45 min, 95 °C por 5 minutos. Após a reação, as amostras de cDNA serão mantidas a -20 °C.

Para garantir a efetividade do tratamento com DNaseI, serão realizadas reações de RT sem a transcriptase reversa, como controle negativo, de RNAs tratados como, anteriormente, descrito. Todas as amostras serão submetidas a esse controle e em seguida, submetidas a uma reação de 20 µl utilizando o sistema de amplificação Taqman® com o sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7000.

## **5. Análise dos resultados**

Para a análise estatística, será empregado o teste T-Student, em caso de amostragem normal, do contrário serão substituídos por testes não paramétricos. Será considerado significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## **6. Descrição da viabilidade da execução do projeto**

O presente projeto é parte de um projeto maior desenvolvido no grupo de pesquisa e é totalmente exequível dentro do prazo proposto e com o material adquirido.

## **7. Referências Bibliográficas**

AHLUWALIA, A.; PERRETI, M. Calcitonin gene-related peptide modulate the acute inflammatory response unduced by interleukin-1 in the mouse. Eur. J. Pharmacol. 264: 407-415, 1994.

BHoola, K. D., FIGUEROA, C. D., WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikrein, kininogens and kininases. Pharmacol. Rev. 44: 1-80, 1992.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. Eur. J. Pharmacol. 429: 161-176, 2001.

DALE, M. M.; FOREMAN, J. C.; FANT-P. Textbook of immunopharmacology. 3rd ed. Blawell Scientific Publication, Oxford. 1994.

DRAY, A.; PERKINS, M. N. Bradykinin and inflammatory pain. Trends Neurosci. 16: 99-104, 1993.

HALL, J. M. Bradykinin receptors. Gen. Pharmacol. 28: 1-6, 1997.

McLEAN, P. G.; PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. Kinin B1 receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc. Res.* 48: 194-210, 2000.

PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Modulation of IL-1 induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J. Immunol.* 150: 992-999, 1993.

RUBIN, E. R.; FARBER, J. L. *Patologia*. Interlivros Edições LTDA. Rio de Janeiro, RJ. 1990.

STERANKA, L. R.; BURCH, R. M. Bradykinin antagonists in pain and inflammation. In *Bradykinin Antagonists. Basic and Clinic Research*. P. 191- 211. Edited by Burch, R. M. Marcel Dekker Inc. New York, Basle, Hong Kong, 1991.

TAKADA, S. H.; SAMPAIO, C. A.; ALLEMANDI, W.; ITO, P. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *J Neurosci Methods*, 198, n. 1, p. 62-69, May 15 2011.

TAKADA, S. H.; DOS SANTOS HAEMMERLE, C. A.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; MACHADO-NILS, A. V. et al. Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience*, 284, p. 247-259, Jan 22 2015.

TAKADA, S. H.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; MACHADO-NILS, A. V.; LEE, V. Y. et al. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. *Behav Brain Res*, 296, p. 331-338, Jan 1 2016.

UNTERBERG, A.; WAHL M.; BAETHMANN A. Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4: 574-85, 1984.

WAHL, M., UNTERBERG, A., BAETHMANN, A.; SCHILLING, L. Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic edema. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8: 621-634, 1988.

WALTRICK, P.T. Envolvimento dos receptores B1 e B2 das cininas no extravasamento plasmático induzido pela bradicinina e desARg<sup>9</sup>-Bradicinina na dura-máter de ratos. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, 2004.

