

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

PATRÍCIA PASSAGLIA

**Efeito da angiotensina-(1-7) central sobre o arco eferente simpático do reflexo
inflamatório em ratos submetidos à endotoxemia**

Ribeirão Preto

_ 2019 _

PATRÍCIA PASSAGLIA

**Efeito da angiotensina-(1-7) central sobre o arco eferente simpático do reflexo
inflamatório em ratos submetidos à endotoxemia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra Evelin Cappelari Carnio

Ribeirão Preto

_ 2019 _

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Passaglia, Patrícia

Efeito da angiotensina-(1-7) central sobre o arco eferente simpático do reflexo inflamatório em ratos submetidos à endotoxemia/ Patrícia Passaglia; orientadora: Prof^ª. Dra. Evelin Capellari Carnio. – 2019.

127 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Versão Original

1. Angiotensina-(1-7). 2. Lipopolissacarídeo. 3. Reflexo inflamatório. 4. Arco eferente simpático. 5. Citocinas pró-inflamatórias. 6. Óxido nítrico. 7. Baço. 8. Reatividade vascular. 9. Hipotensão. I. Carnio, Evelin Capellari, orient. II. Título.

Nome: PASSAGLIA, Patrícia

Título: Efeito da angiotensina-(1-7) central sobre o arco eferente simpático do reflexo inflamatório em ratos submetidos à endotoxemia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor Ciências (área de
concentração: Fisiologia).

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico essa tese aos meus pais Martha e Osvaldo pelo amor incondicional e por me ensinar a persistir diante às dificuldades encontradas no decorrer da trajetória acadêmica. Vocês são meus exemplos de vida e perseverança. Às minhas irmãs Jaqueline e Vanessa, por todo amor, amizade e por ensinarem a importância do compartilhar e respeitar as diferenças, elementos essenciais para um bom trabalho em grupo. Também dedico essa tese ao meu noivo Felipe, por seu meu porto seguro, meu amparo e por me mostrar que a vida pode ser incrível quando reaprendemos a olhar o mundo. Obrigada a todos pelo incentivo e apoio, sem vocês seria impossível a realização dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À toda minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

A minha orientadora Evelin Capellari Carnio pela oportunidade a mim concedida, pelo apoio, confiança e por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional. O meu muito obrigada pelos inúmeros ensinamentos de vida e por me ensinar a voltar a acreditar e não desistir diante às adversidades. Você é um exemplo de profissional que respeita e encoraja seus orientandos.

Ao professor Guilherme Branco pelos ensinamentos e pela possibilidade em colaborar com seu laboratório, o meu muito obrigada!

Ao querido amigo e companheiro de laboratório Marcelo Eduardo Batalhão, pela gentileza, amizade e respeito. Muito obrigado, meu amigo, por ser minhas mãos em tantos momentos, sem sua ajuda este trabalho não poderia ser executado.

À Prof^a Dra. Angelita Maria Stábile, exemplo de profissional que ama e luta por aquilo que acredita. Obrigada pelo apoio, por todo incentivo e por me mostrar o maravilhoso mundo da cultura celular. Agradeço por tantos ensinamentos e tantos bons conselhos nessa incrível jornada acadêmica. Te tenho como exemplo de respeito e persistência, e pela incrível capacidade didática de tornar simples assuntos, muitas vezes, tão complexos.

À minha querida amiga Aline de Jesus, que fez parte de todos esses momentos me ajudando e incentivando. Obrigada por tantas conversas, risadas e ensinamentos. Você é uma pessoa incrível que sempre me impulsionou em direção às vitórias dos meus desafios. Agradeço por tanto.

Ao meu amigo André Luiz Thomaz de Souza, pelas inúmeras risadas, boas conversas e tantos ensinamentos. Obrigada pela oportunidade de trabalhar e colaborar contigo, você é um excelente profissional e um exemplo de como a humildade é fundamental para alcançarmos nossos objetivos.

Ao Dr. Alexandre Kanashiro por ser parte tão importante no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por tamanha atenção, contribuição e pelos inúmeros ensinamentos. Agradeço muito pelo voto de confiança depositado a mim e às minhas ideias que foram, por muitos, desacreditadas.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues e à Prof^a Dra. Lucila Leico K. Elias, ambos da FMRP-USP, pelo apoio e colaboração na utilização dos aparelhos e técnicas de dosagens hormonais.

À técnica Maria Valci dos Santos e a especialista Milene Mantovani Lopes pelos ensinamentos e colaboração nos protocolos de radioimunoensaio.

À Prof^a Dra. Lusiane Maria Bendhack pela oportunidade de utilizar os equipamentos de seu laboratório na Faculdade de Farmácia da USP, pela gentileza, respeito e por tantos ensinamentos que levarei para minha acadêmica. Obrigada por me mostrar e ensinar o valor do respeito e da humildade para a formação profissional.

À pós-doc Micheli Paulo por confiar em minhas ideias e contribuir para que elas fossem executadas. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e toda ajuda em todo esse processo.

À técnica Juliana Vercesi por me ajudar tanto e me reensinar o protocolo de reatividade vascular. Obrigada por tamanha ajuda e por tão bons momentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMRP/USP, por partilharem seus conhecimentos e contribuírem para minha formação acadêmica.

À Cláudia de Barcellos Vanzela, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da FMRP/USP, por sua delicadeza e sua disposição indefectível em ajudar nas questões burocráticas e informativas. O meu muito obrigada também aos funcionários da secretaria do

departamento Elisa Maria Aleixo, Cláudia de Barcello Vanzela, Fernando César Rastello, Igor Mateus da Silva pela atenção e ajuda em tantos momentos. Obrigada pela paciência em tantos momentos de desespero e dúvida.

À Prof^a Dra Rhian Touyz pela incrível oportunidade de aprendizado e desenvolvimento pessoal. Obrigada por acreditar em minhas capacidades e por me mostrar como um acadêmico deve ser e se portar diante seus alunos.

Ao Dr. Augusto Montezano, a quem não tenho palavras suficientes para agradecer tamanha ajuda. Obrigada por me fazer redescobrir a confiança e por me fazer acreditar que era capaz. Minha admiração e respeito por seu profissionalismo são imensos. E aproveito para agradecer à Dra Livia De Lucca Camargo e ao Dr. Francisco Rios por tantos ensinamentos, paciência, risadas e bons momentos. Agradeço também aos doutores Karla e Rheure, amigos que me ajudaram muito e tornaram mais leve essa incrível experiência internacional; aos meus novos amigos Carolina, Josiane e Mateus, que se tornaram minha família, me ensinaram tanto sobre a vida e me fizeram desfrutar de tantas alegrias; e aos meus amigos Aline, Raquel, Amauri, Yu, Steve, Rashida, Eva, Maria, Richard, Aikaterine, Natan, Emily, Jack e Wendy, que me proporcionaram tantos bons momentos e compartilharam comigo tantas experiências.

À Lucimara, minha amiga que cuida tão bem do nosso laboratório e nos proporciona tantos ensinamentos de vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro para a execução deste projeto (n.º 2014/22477-6), sem o qual a realização deste trabalho não seria possível. Agradeço também pelo auxílio BEPE a mim concedido (n.º 2018/11464-1), que me possibilitou ampliar e desenvolver minhas capacidades.

“Sempre que chamados à crítica, respeitemos o esforço nobre dos semelhantes. Para construir, são necessários amor e trabalho, estudo e competência, compreensão e serenidade, disciplina e devotamento. ”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

PASSAGLIA, Patrícia. **Efeito da angiotensina-(1-7) central sobre o arco eferente simpático do reflexo inflamatório em ratos submetidos à endotoxemia.** 2019. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Recentemente, tem sido investigada a participação do componente simpático eferente do reflexo inflamatório na modulação do sistema imunológico em modelos de inflamação sistêmica. Esta modulação envolve: (a) a transmissão do sinal imune periférico ao sistema nervoso central (SNC) através da ativação das fibras vagais aferentes pelas citocinas pró-inflamatórias; (b) o processamento do sinal imune pelo núcleo do trato solitário (NTS) e a ativação de áreas que recebem projeções desse centro integrador, tais como o núcleo rostroventrolateral do bulbo (RVLM) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN); e (c) a ativação do nervo esplâncnico e esplênico, resultando em imunossupressão. A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], vem sendo apontada como importante neuropeptídeo anti-inflamatório em diversos modelos de inflamação. Entretanto, não há descrita na literatura uma possível ação da Ang-(1-7) sobre o eixo simpático eferente para o controle da resposta inflamatória na endotoxemia. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar se a Ang-(1-7) pode modular a resposta inflamatória nos ratos endotoxêmicos, via mecanismo central, e se esse efeito é mediado pelo componente simpático eferente do reflexo inflamatório. Para isto, foram utilizados ratos *Wistar* (215-220 g) que foram submetidos às cirurgias estereotáxica (para administração intracerebroventricular, icv) e de canulação da veia jugular (para administração endovenosa, ev) e da artéria femoral (para aferição da pressão arterial média, PAM e frequência cardíaca, FC). Também foi realizada a simpatectomia química pela administração ev de 6-OHDA (100 mg/Kg) por 24 h. A endotoxemia foi induzida pela administração ev de lipopolissacarídeo (LPS) (1.5 mg/Kg) de acordo com o protocolo experimental avaliado. Observou-se, nos protocolos *in vivo*, que a administração icv de Ang-(1-7) (0.3 nmol 2 μ L), via receptor Mas (A779, antagonista seletivo, 3 nmol 2 μ L) não alterou o aumento na concentração plasmática de corticosterona e AVP, mas atenuou a concentração sérica e tecidual (baço e fígado) das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e de óxido nítrico (NO) induzida pelo LPS, além de elevar a concentração de interleucina-10 (IL-10), e esta ação anti-inflamatória foi abolida com a

simpatectomia química. Um perfil similar de resposta foi observado no protocolo *in vitro*, onde a dose de LPS (1 µg/mL), após 24 h, foi capaz de induzir a síntese de TNF-α e a expressão proteica da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), enquanto à estimulação com noradrenalina (NE; 0.1 µM) atenuou esses efeitos nos macrófagos peritoneais. Em um segundo protocolo *in vivo*, verificamos que a Ang-(1-7) foi capaz de restabelecer a pressão arterial média (PAM), sem afetar a resposta taquicardica induzida pelo LPS. No protocolo *ex vivo*, os anéis de artéria aorta torácica dos animais endotoxêmicos apresentaram hiporesponsividade à NE, de maneira dependente da produção de NO pelo tecido perivascular (PVAT) e de hiperpolarização, enquanto a administração icv Ang-(1-7) restabeleceu a responsividade vascular. Em outro set de protocolos *in vitro*, utilizando a cultura de células da musculatura lisa vascular (VSMC), verificou-se que a produção de NO e TNF-α pelo PVAT, em resposta ao LPS (1 h). Já a estimulação conjunta com NE, atenuou o efeito pró-inflamatório do LPS sobre o PVAT e elevou a concentração intracelular de Ca⁺² ([iCa⁺²]) nas VSMC. Em conjunto, os resultados sugerem que a Ang-(1-7), via receptor Mas, module o componente simpático do reflexo inflamatório e exerça seu efeito anti-inflamatório sobre o baço, fígado e PVAT, resultando no restabelecimento da responsividade vascular e hipotensão, que podem ter sido responsáveis pela melhora na sobrevivência dos ratos tratados com LPS.

Palavras-chave: Angiotensina-(1-7). Lipopolissacarídeo. Reflexo inflamatório. Arco eferente simpático. Citocinas pró-inflamatórias. Óxido nítrico. Baço. Reatividade vascular. Hipotensão.

ABSTRACT

PASSAGLIA, Patrícia. **Central Angiotensin-(1-7) effects on sympathetic efferent arc of inflammatory reflex in rats submitted to endotoxemia.** 2019. 127 sheets. Thesis (Ph.D. in Sciences, area of concentration: Physiology) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Currently, it has been investigated the participation of sympathetic efferent component of inflammatory reflex in system immune modulation in inflammatory experimental models. This modulation involves: (a) the peripheral signal immune transmission for central nervous system (CNS) through afferent vagal activation by proinflammatory cytokines; (b) immune signal processing by nucleus tractus solitarius (NTS) and activation of others areas, such as the rostral ventrolateral medulla (RVLM) and the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN); (c) the nerves splanchnic and splenic activation resulting in immunodepression. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] has been pointed as important anti-inflammatory neuropeptide in a number of inflammatory models. However, a possible action of Ang-(1-7) on sympathetic efferent axis to inflammatory response control in endotoxemia has not been described in the literature. Thus, the aim of this study was to determine whether the Ang-(1-7) can modulate the systemic inflammatory response in endotoxemic animals via a central mechanism, and whether this effect is mediated by a sympathetic circuit. In this way, we used male *Wistar* rats (215-220 g) submitted to stereotaxic (for central administration), jugular vein cannulation (for endovenous administration) and femoral artery (for blood pressure and heart ratio measurement) surgeries. Furthermore, was performed a chemical sympathectomy induced by systemic administration of 6-OHDA (100 mg/Kg) for 24 h. Endotoxemia was induced by systemic administration of lipopolysaccharide (LPS) (1.5 mg/Kg) in accordance with experimental protocol assessed. LPS was induced increase in corticosterone and AVP plasma concentration and central Ang-(1-7) administration (0.3 nmol 2 μ L) was not able to change this effect.. We also observed that Ang-(1-7) central administration, via Mas receptor (A779, selective antagonist, 3 nmol 2 μ L) was able to attenuate serum and tissue (spleen and liver) of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and NO concentration LPS-induced and increased interleukin-10 (IL-10) and the chemical sympathectomy abolished this anti-inflammatory. Similar profile was observed in *in vitro* protocol where the LPS dose (1 μ g/mL, for 24 h) induced TNF- α synthesis and protein

expression of inducible oxide nitric synthase (iNOS) enzyme, whereas these effects were attenuated by noradrenaline (NE; 0.1 μ M) stimulation in peritoneal macrophages culture. In a second *in vivo* protocol we verified that mean blood pressure was restored by Ang-(1-7) without affecting the tachycardia LPS-induced. When the effect of LPS treatment was analyzed, rings of thoracic aorta artery of endotoxemic rats, we observed a low resistance in response to NE and this effect was dependent on perivascular adipose tissue (PVAT) NO secretion and vascular hyperpolarization, while Ang-(1-7) central administration was able to restore the vascular responsiveness. In another *in vitro* protocol, using vascular smooth muscle cells (VSMC) culture we observed that NO and TNF- α PVAT production LPS-induced (for 1 h) may have caused decrease of calcium (Ca^{+2}) cytoplasmatic concentration. Concomitant stimulation of NE and LPS stimulation have reduced proinflammatory effect of LPS on PVAT and increased intracellular Ca^{+2} concentration ($[\text{iCa}^{+2}]$) in VSMC. Taken together, these data suggest that Ang-(1-7), via Mas receptor, controls the sympathetic component of inflammatory reflex and exerts anti-inflammatory effect on spleen, liver and PVAT resulting in vascular responsiveness and blood pressure recovery, wich could be responsible, at least in part, for the improvement in survival in rats treated with LPS.

Key words: Angiotensin-(1-7). Lipopolysaccharide. Inflammatory reflex. Sympathetic efferent arc. Pro-inflammatory cytokines. Nitric oxide. Spleen. Vascular reactivity. Hypotension.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado das vias aferentes e eferentes de regulação do sistema imunológico na endotoxemia. Adaptado de Abe e Inoue (2018). As linhas pretas contínuas indicam ativação, enquanto a linha pontilhada indica uma ação inibitória.....4
- Figura 2.** Esquema simplificado da via anti-inflamatória do reflexo inflamatório descrito anteriormente no texto acima. Adaptado de Abe e Inoue (2018).....6
- Figura 3.** Hipótese do presente estudo onde se infere o efeito anti-inflamatório sistêmico da Ang-(1-7) através da ativação do componente simpático eferente do reflexo inflamatório na endotoxemia.....9
- Figura 4.** Esquema simplificado 1 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.....16
- Figura 5.** Esquema simplificado 2 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.....16
- Figura 6.** Esquema simplificado 3 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.....16
- Figura 7.** Esquema simplificado 4 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.....17
- Figura 8.** Esquema simplificado 5 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.....17
- Figura 9.** Esquema simplificado 6 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.....17
- Figura 10.** Esquema simplificado 7 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e para avaliação, *ex vivo*, da reatividade vascular realizada no presente estudo.....17
- Figura 11.** Esquema simplificado 8 da obtenção dos anéis de aorta torácica (com e sem PVAT) para avaliação, *ex vivo*, da reatividade vascular.....18
- Figura 12.** Esquema simplificado 9 do protocolo de obtenção do PVAT e de seu produto, que foi utilizado como estímulo, *in vitro*, das VSMC, para avaliação da produção de mediadores inflamatórios e função vascular. Adaptado de Lee et al. (2014).....19
- Figura 13.** Avaliação da permeabilidade da BHE em animais submetidos ao LPS (1.5 mg/Kg) por 2 h. N = 10, valores expressos em média \pm SEM, n = 10 por grupo experimental.....27
- Figura 14.** Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) sobre o percentual de sobrevivência dos ratos submetidos à endotoxemia (1.5 mg/Kg) por 72 h. Valores expressos em porcentagem. *p < 0,05 *versus* respectivo grupo controle.....28

Figura 15. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) e A779 (3 nmol em 2 µL) sobre a concentração sérica de TNF-α (A), IL-1β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e simpatectomia química por 24 h. Valores expressos em média ± SEM, n = 7-18. ND.: valor não detectável. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0,05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....29

Figura 16. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) e A779 (3 nmol em 2 µL) sobre a concentração plasmática de NOx dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e simpatectomia química por 24 h. Valores expressos em média ± SEM, n = 7-18. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0,05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....30

Figura 17. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) sobre a concentração de TNF-α (A), IL-10 (B) e NOx (C) no baço dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e simpatectomia química por 24 h. Valores expressos em média ± SEM, n = 6-9. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0,05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....31

Figura 18. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) sobre a concentração de TNF-α (A), IL-10 (B) e NOx (C) no fígado dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e simpatectomia química por 24 h. Valores expressos em média ± SEM, n = 8-10. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0,05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....31

Figura 19. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) e A779 (3 nmol em 2 µL) sobre a concentração plasmática de corticosterona (A) e AVP (B) dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg). Valores expressos em média ± SEM, n = 4-10. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....32

Figura 20. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) na PAM (A) e FC (B) dos ratos submetidos à endotoxemia (1.5 mg/Kg) ao longo de 6 h. Valores expressos em média ± SEM, n = 5-7. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS. ANOVA-*two way*, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....33

Figura 21. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) sobre a concentração de TNF-α no coração dos ratos 6 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg). Valores expressos em média ± SEM, n = 7-8. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....34

Figura 22. Efeito da administração sistêmica de LPS (1.5 mg/Kg), após 1h, sobre a reatividade vascular da artéria aorta torácica à NE na ausência ou presença de PVAT. Valores expressos em média ± SEM, n = 5-12. #p < 0,05 versus grupo LPS sem PVAT (PVAT⁻). ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....35

Figura 23. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) sobre a reatividade vascular da artéria aorta torácica à NE na ausência (A) ou presença de L-NAME (B), TEA (C) e AVP (D) dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg). Valores expressos em média \pm SEM, n = 5-12. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....36

Figura 24. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) sobre a concentração de NO na artéria aorta torácica com PVAT dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e a simpatectomia química por 24 h. N = 5, valores expressos em média \pm SEM. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS, &p < 0,05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....38

Figura 25. Efeito da estimulação da NE (0.1 μ M) sobre a síntese de TNF- α (A), IL-10 (B) e NOx (C) no PVAT exposto ao LPS (1 μ g/mL) por 1 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 3 (pool de 2 animais em cada n). *p < 0,05 versus PVAT não estimulado, #p < 0,05 versus PVAT estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....39

Figura 26. Efeito da estimulação do “produto do PVAT”, por 30 min, sobre a produção de NO na cultura de VSMC. Valores expressos em intensidade de fluorescência, n = 4. *p < 0,05 versus “produto do PVAT” não estimulado, #p < 0,05 versus “produto do PVAT” estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....40

Figura 27. Efeito da estimulação do “produto do PVAT” na presença de aminoguanidina (100 μ M), por 30 min, sobre a produção de NO na cultura de VSMC. Valores expressos em intensidade de fluorescência, n = 4. #p < 0,05 versus “produto do PVAT” estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....41

Figura 28. Efeito da estimulação do “produto do PVAT”, por 30 min, sobre a $[iCa^{+2}]$ na cultura de VSMC. Valores expressos em intensidade de fluorescência, n = 4. *p < 0,05 versus “produto do PVAT” não estimulado, #p < 0,05 versus “produto do PVAT” estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....41

Figura 29. Efeito da estimulação do “produto do PVAT” na presença ou ausência de TEA (100 μ M) por 30 min, sobre a $[iCa^{+2}]$ na cultura de VSMC. Valores expressos em intensidade de fluorescência, n = 4. #p < 0,05 versus “produto do PVAT” estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....42

Figura 30. Efeito da estimulação da NE (0.1 μ M) sobre a síntese de TNF- α nos macrófagos peritoneais expostos ao LPS (1 μ g/mL) por 24 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 5-6. *p < 0,05 versus macrófago não estimulado, #p < 0,05 versus macrófago estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....43

Figura 31. Efeito da estimulação da NE (0.1 μ M) sobre a expressão proteica da iNOS nos macrófagos peritoneais expostos ao LPS (1 μ g/mL) por 24 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 5-6. *p < 0,05 versus macrófago não estimulado, #p < 0,05 versus macrófago estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.....43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença ou ausência de PVAT, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ou não ao LPS.....35
- Tabela 2** - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença de PVAT, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ou não ao LPS.....36
- Tabela 3** - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença ou ausência de L-NAME, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ou não ao LPS.....37
- Tabela 4** - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença ou ausência de TEA, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ou não ao LPS.....37
- Tabela 5** - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença ou ausência AVP, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ao LPS.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
ANOVA	Análise de variância
AVP	Hormônio Arginina Vasopressina
AVPR1b	Receptor do tipo 1b de AVP
A779	Antagonista seletivo do receptor Mas
BAT	do inglês, <i>Brown adipose tissue</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CRH	Hormônio liberador de ACTH
CVO	Órgão circumventricular
DAF	Diaminofluoresceína diacetato
DMV	Núcleo dorsal motor vagal do bulbo
ECA	Enzima conversora de Angiotensina
ECA 2	Enzima conversora de Angiotensina 2
ELISA	do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
E _{max}	Efeito máximo desencadeado pela concentração supra-máxima do agonista
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ev	Administração endovenosa
FC	Frequência cardíaca
	4-(6-Acetoxymethoxy-2,7-dichloro-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl 2,2' (ethylenedioxy)dianiline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis

Fluo-3AM	(acetoxymethyl) ester
GR	do inglês, <i>glucocorticoid receptor</i>
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
icv	Administração intracerebroventricular
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IML	Coluna intermediolateral da coluna espinal
iNOS	Isoforma induzível da enzima Óxido nítrico sintase
ip	Administração intraperitoneal
[Ca^{+2}] _i	Concentração intracelular de Cálcio
JAK2	do inglês, <i>Janus Kinase 2</i>
LBP	do inglês, <i>LPS-binding protein</i>
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
L-NAME	N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
MAPK	do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MD2	Proteína mielóide diferenciadora 2
n	Número amostral de casa protocolo experimental
NA	Núcleo Ambíguo
ND	Valores não-detectáveis
NE	Noradrenalina
Nf κ B	Fator de transcrição nuclear κ B
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal

NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NOx	Concentração de Nitrato/nitrito
NTS	Núcleo do Trato solitário
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>
pD2	ou EC50, 50% do efeito máximo promovido pelo agonista
PE	Polietileno
PVAT	Tecido perivascular aórtico
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RIE	Radioimunoensaio
RVLM	Núcleo rostroventrolateral do bulbo
SEM	Erro padrão da média
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema Renina Angiotensina
STAT3	do inglês, <i>signal transducers and activators of transcription 3</i>
TEA	Tetraetilamônio, inibidor não-seletivo dos canais de Potássio
TLR4	Receptor do tipo <i>Toll-like 4</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VSMC	do inglês, <i>Vascular smooth muscle cells</i>
α 7nAChR	Receptor nicotínico alfa 7 de Ach
6-OHDA	6-Hidroxiopamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Animais	13
3.2 Drogas utilizadas	13
3.3 Procedimentos cirúrgicos	13
3.3.1 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	13
3.3.2 CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR.....	14
3.3.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL.....	14
3.3.4 SIMPATECTOMIA QUÍMICA.....	15
3.4 Protocolos de administração das drogas	15
3.5 Protocolos experimentais	15
3.5.1 PROTOCOLOS <i>IN VIVO</i> E <i>EX VIVO</i>	16
3.5.2 PROTOCOLOS <i>IN VITRO</i>	18
3.5.2.1 Cultura de células da musculatura lisa vascular.....	18
3.5.2.2 Cultura de macrófagos peritoneais.....	19
3.6 Obtenção das amostras	20
3.6.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TECIDUAL DE PROTEÍNA.....	20
3.7 Técnicas	21
3.7.1 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA.....	21
3.7.2 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BHE.....	22
3.7.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA E TECIDUAL DE CITOCINAS POR ELISA.....	22
3.7.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA E TECIDUAL DE NITRATO/NITRITO (NO _x).....	22
3.7.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE AVP E CORTICOSTERONA.....	22
3.7.6 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FC NOS RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	23
3.7.7 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DA AORTA TORÁCICA.....	23
3.7.8 DETERMINAÇÃO, <i>IN VITRO</i> , DO NO E DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE CÁLCIO (Ca^{+2})	24

3.7.9	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE iNOS.....	24
3.8	Análise estatística.....	25
4	RESULTADOS.....	27
4.1	A administração sistêmica de LPS não alterou a permeabilidade da BHE no presente modelo experimental.....	27
4.2	A administração central de Ang-(1-7) eleva a taxa de sobrevivência dos animais endotoxêmicos.....	27
4.3	O eixo Ang-(1-7)/receptor Mas central exerceu efeito anti-inflamatório periférico através da modulação do componente neural simpático do reflexo inflamatório.....	28
4.4	A administração central de Ang-(1-7) reduziu a concentração tecidual de mediadores pró-inflamatórios através da modulação do componente neural simpático do reflexo inflamatório.....	30
4.5	A administração central de Ang-(1-7) não alterou as concentrações plasmáticas de corticosterona e AVP.....	31
4.6	A administração central de Ang-(1-7) atenuou a hipotensão inicial induzida pelo LPS, sem afetar a FC.....	32
4.7	A Ang-(1-7) central atenuou a hiporresponsividade à NE, dependente do PVAT, induzida pelo LPS.....	34
4.8	A estimulação com NE, <i>in vitro</i> , reduziu a inflamação no PVAT induzida pelo LPS.....	38
4.9	O “produto do PVAT” modula a síntese de NO e a $[Ca^{+2}]_i$ na cultura das VSMC.....	39
4.10	A estimulação com NE reduz a síntese de TNF- α e a expressão da iNOS induzidas pelo LPS na cultura de macrófagos peritoneais.....	42
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	55
	APÊNDICE A.....	67

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A resposta imunológica é uma reação aos componentes de microrganismos, às macromoléculas e às substâncias químicas reconhecidas como antígenos pelo organismo (ABBAS, 2011). A resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa, sendo a resposta inata inespecífica, enquanto a resposta imune adaptativa é mais específica, tornando-a eficiente contra diferentes tipos de patógenos (MEDZHITOV, 2010).

A imunidade inata consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que respondem rapidamente ao desafio imunológico. Os neutrófilos, os monócitos e macrófagos são importantes células fagocíticas que compõem o sistema imune inato e que reconhecem estruturas moleculares típicas de patógenos microbianos, denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (ABBAS, 2011). O LPS, endotoxina proveniente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, é um exemplo notório de PAMP.

Na circulação sistêmica, o LPS liga-se a uma glicoproteína de fase aguda denominada LBP (do inglês “LPS-binding protein”) e ao CD14, molécula encontrada na membrana celular de fagócitos ou na forma solúvel. Depois de formado, o complexo (LPS-LBP-CD14) é reconhecido e interage com receptor *Toll-like* tipo 4 (TLR4) associado à proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2), presente na membrana plasmática de células fagocíticas e em células que não compõem o sistema imunológico, tais como as células endoteliais (EHRENTAUT et al., 2007). Dessa forma, o LPS é considerado um potente ativador do sistema imune inato e conseqüentemente, capaz de induzir uma resposta inflamatória generalizada (OPAL; HUBER, 2002). Nesse sentido, a endotoxemia - que consiste na administração de LPS, sem a presença de um foco infeccioso - é considerada um importante modelo experimental para o estudo da inflamação sistêmica aguda (DOI et al., 2009).

Da ativação imunológica induzida pelo LPS, resulta uma exacerbada síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas (KRITSELIS et al., 2013). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, a concentração sérica do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é considerada um importante indicador da resposta inflamatória aguda (KAKIZAKI et al. 1999). Produzido principalmente por macrófagos, o TNF- α induz a migração e ativa funções de neutrófilos e a diferenciação de leucócitos mononucleares. Ainda nesse contexto, a síntese e liberação de interleucina-10 (IL-10), um mediador anti-inflamatório, também pode refletir a intensidade/severidade da resposta inflamatória (HICKEY et al., 1998; OBERHOLZER; OBERHOLZER; MOLDAWER, 2002).

A ativação do sistema imune ocorre para eliminar o agente causador da resposta inflamatória e restaurar a homeostase. Entretanto, a ativação exacerbada desse sistema pelo LPS pode levar a injúrias e danos ao organismo. Assim, é importante que haja modulação no processo de resolução da inflamação sistêmica (MEDZHITOV, 2010). Estudos recentes demonstram a existência da comunicação bidirecional entre o sistema imune e o SNC na modulação da resposta inflamatória periférica (MCCUSKER; KELLEY, 2013; QUAN, 2014). As aferências imunológicas transmitem sinais ao cérebro através de diferentes vias. Um dos primeiros caminhos aferentes propostos foi o da comunicação direta das citocinas em receptores específicos presentes nos órgãos circunventriculares (CVOs), que são desprovidos de BHE (BANKS, 2015). Outra possibilidade seria pelo aumento na permeabilidade da BHE em função da administração de LPS, na qual permitiria a ação local desses mediadores inflamatórios no SNC (TACCONE et al, 2010). Por fim, a comunicação periferia-cérebro pode ocorrer através da ativação de fibras nervosas sensoriais (BLATTEIS et al., 1987; STITT, 1990).

O nervo vago é apontado como importante componente aferente da via neural de comunicação (ELMQUIST et al., 1993). Wan et al. (1994) demonstraram que a vagotomia subdiafragmática total impediu a expressão de c-Fos em neurônios do hipotálamo e tronco encefálico em resposta à injeção intraperitoneal de LPS, propondo assim, que a sinalização imune-neural aferente seja dependente do nervo vago. Hosoi et al. (2005) mostraram, pela primeira vez, a expressão do TLR4 no gânglio nodoso propondo assim, que o LPS - bem como os mediadores inflamatórios por ele induzidos - é capaz de ativar diretamente o nervo vago. Dessa forma, o nervo vago, bem como os neurônios ativos nos CVOs (CAI et al., 1996), são capazes de detectar e transmitir os sinais inflamatórios, predominantemente, para o NTS. Os neurônios do NTS, por sua vez, projetam-se para o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) (KAWANO; MASUKO, 2010) - além de outras regiões do SNC - e modulam importantes vias eferentes de controle do sistema imune: o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (BESEDOVSKY et al. 1986); a liberação de neurohormônios, como por exemplo a AVP; e a via neural autonômica (ANDERSSON; TRACEY, 2012).

Na inflamação, a modulação do eixo HHA inicia-se com a ativação dos neurônios parvocelulares do PVN e liberação do hormônio liberador de corticotropina (do inglês, *corticotrophin-releasing hormone* - CRH) no sistema porta-hipofisário, na qual atinge a hipófise anterior e estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (do inglês, *adrenocorticotrophic hormone* - ACTH) para a circulação sistêmica. Na circulação, o ACTH

atua no córtex da glândula adrenal e estimula a liberação sistêmica de corticosterona em roedores.

A corticosterona exerce um efeito bidirecional na regulação da resposta inflamatória, dependendo das suas concentrações plasmáticas. Quando em concentrações plasmáticas altas, esse glicocorticoide possui efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, como descrito previamente em outros estudos experimentais (ZHANG; DAYNES, 2007; FRANK et al., 2010). Um dos mecanismos pelo qual a corticosterona exerce seus efeitos anti-inflamatórios dá-se pela sua capacidade de interagir com as isoformas do receptor GR (do inglês, *glucocorticoid receptor*) e modular a síntese de mediadores pró-inflamatórios em órgãos linfoides, como o baço.

Em relação à AVP, recentemente têm-se demonstrado que esse neurohormônio possui efeitos importantes na modulação da resposta inflamatória, além de seus efeitos fisiológicos vasocontráteis e renais (RUSSELL; WALLEY, 2010). Esse efeito imunomodulador está associado à capacidade interagir com o receptor 1b de vasopressina (AVPR1b) e induzir a liberação de ACTH e conseqüentemente, de corticosterona, de forma sinérgica ao CRH (LOLAIT et al., 2007; RUSSELL; WALLEY, 2010). Assim, a ativação do eixo HHA e a liberação de AVP constituem o denominado eixo eferente humoral de modulação do sistema imunológico.

Além do eixo humoral de modulação do sistema imune, anteriormente descrito, o controle da resposta inflamatória periférica pode-se dar através da ativação de vias neurais autonômicas eferentes do reflexo inflamatório (BOROVIKOVA et al., 2000; ANDERSSON; TRACEY, 2012; MARTELLI et al., 2014; PAVLOV; TRACEY, 2017).

O esquema apresentado abaixo demonstra, de forma simplificada, as vias de comunicação periferia-cérebro de regulação imune descritas anteriormente (Figura 1).

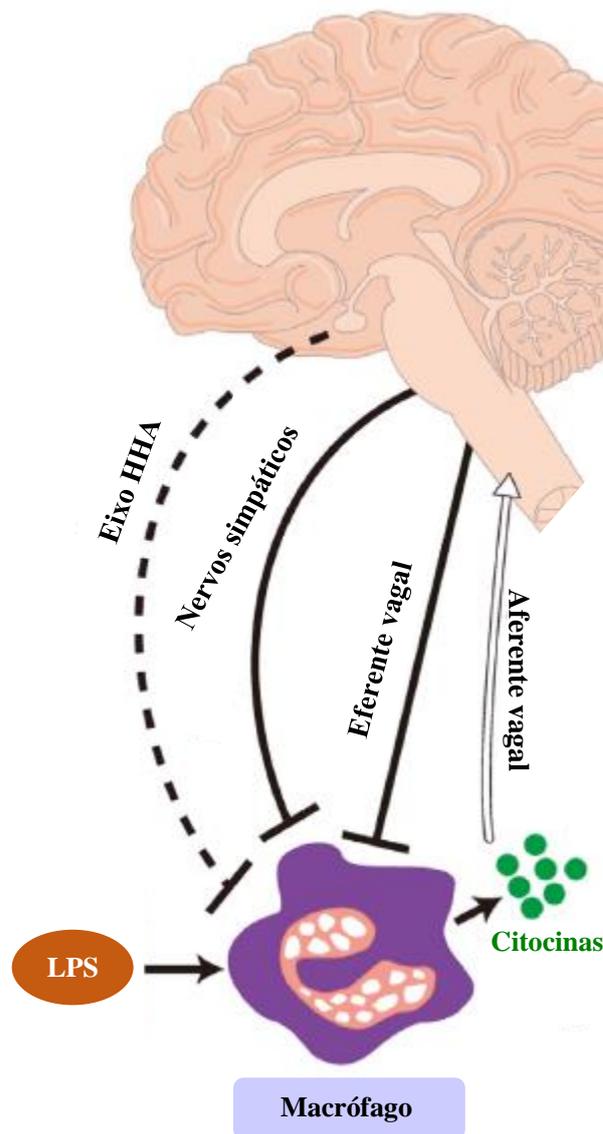


Figura 1. Esquema simplificado das vias aferentes e eferentes de regulação do sistema imunológico na endotoxemia. Adaptado de Abe e Inoue (2018). Linhas pretas contínuas indicam ativação, enquanto a linha pontilhada indica uma ação inibitória.

Dentre as vias eferentes descritas, a via neural vem ganhando destaque devido sua rápida resposta regulatória sobre o sistema imune. Dados recentes sugerem que a regulação do reflexo inflamatório pode prevenir a inflamação sistêmica na endotoxemia (HUSTON, 2012).

Os nervos autonômicos eferentes (viscerais) são potentes reguladores da imunidade e apresentam efeitos anti-inflamatórios através de seus dois braços: parassimpático e simpático. Em relação ao componente parassimpático do reflexo inflamatório destaca-se o nervo vago. A fibra vagal eferente origina-se no núcleo dorsal motor vagal (do inglês, *brainstem dorsal motor nucleus of the vagus*) (DMN) e no núcleo ambíguo (NA), no bulbo. Esses neurônios pré-ganglionares colinérgicos projetam-se para órgãos viscerais da cavidade abdominal e

torácica, incluindo fígado e coração. Na proximidade ou nos órgãos, eles interagem com neurônios vagais pós-ganglionares liberando acetilcolina (Ach) (PAVLOV et al., 2003). O nervo vago pré-ganglionar também pode terminar no gânglio celíaco e gânglio mesentérico superior, onde se origina o nervo esplênico. Os neurônios do nervo esplênico são catecolinérgicos e liberam NE no baço, atuando assim como um dos componentes simpáticos da regulação imune. Ainda em relação ao arco simpático eferente, o *locus coeruleus* (LC) e o RVLM são importantes regiões associadas com o controle simpático. Do RVLM partem projeções descendentes de neurônios C1 (catecolinérgicos e dopaminérgicos) para o núcleo intermediolateral (IML) da coluna espinal (ABEA; INOUE, 2018). Fibras pré-ganglionares do nervo esplâncnico são projetadas para o gânglio pré-vertebral, incluindo o gânglio celíaco, e as fibras pós-ganglionares liberam NE nos órgãos viscerais. As fibras pré-ganglionares também inervam a medula da adrenal, estimulando a secreção de adrenalina pelas células cromafins (CHAVAN; PAVLOV; TRACEY, 2017; MARTELLI et al., 2019).

No baço, a NE liberada das terminações nervosas, interage com os receptores β_2 -adrenérgicos presente nos linfócitos T, liberando Ach que então exerce ação anti-inflamatória através da atuação no receptor nicotínico alfa 7 de Ach ($\alpha 7nAChR$) expresso nos esplenócitos (OLOFSSON et al., 2012). A ativação do receptor α -7 nicotínico desencadeia uma série de mecanismos de sinalização que resultam em efeitos anti-inflamatórios diretos através da diminuição da translocação para o núcleo do fator de transcrição nuclear kB (NF- κ B), ou indiretos através da ativação do fator transcricional STAT3, via fosforilação pela JAK2 (do inglês, *Janus Kinase 2*).

O baço, órgão linfoide secundário, em particular, é um potencial alvo das ações do LPS e é um dos responsáveis pela elevada produção de TNF- α (MELTZER et al., 2003). No modelo endotoxêmico, Ji et al. (2014) relataram que a estimulação elétrica do nervo vago eferente reduz a intensa resposta inflamatória induzida pelo LPS por um mecanismo dependente do baço e de sua inervação simpática. Outros estudos recentes também têm demonstrado a importância dos nervos esplâncnico e esplênico, e dos demais componentes simpáticos do reflexo inflamatório na regulação imune (MARTELLI et al., 2014; MARTELLI et al., 2014).

A figura 2 traz, de forma sucinta, as principais áreas integradoras dos sinais imunes no SNC, os eferentes simpáticos e o baço, como importante órgão efetor da ação anti-inflamatória do reflexo inflamatório.

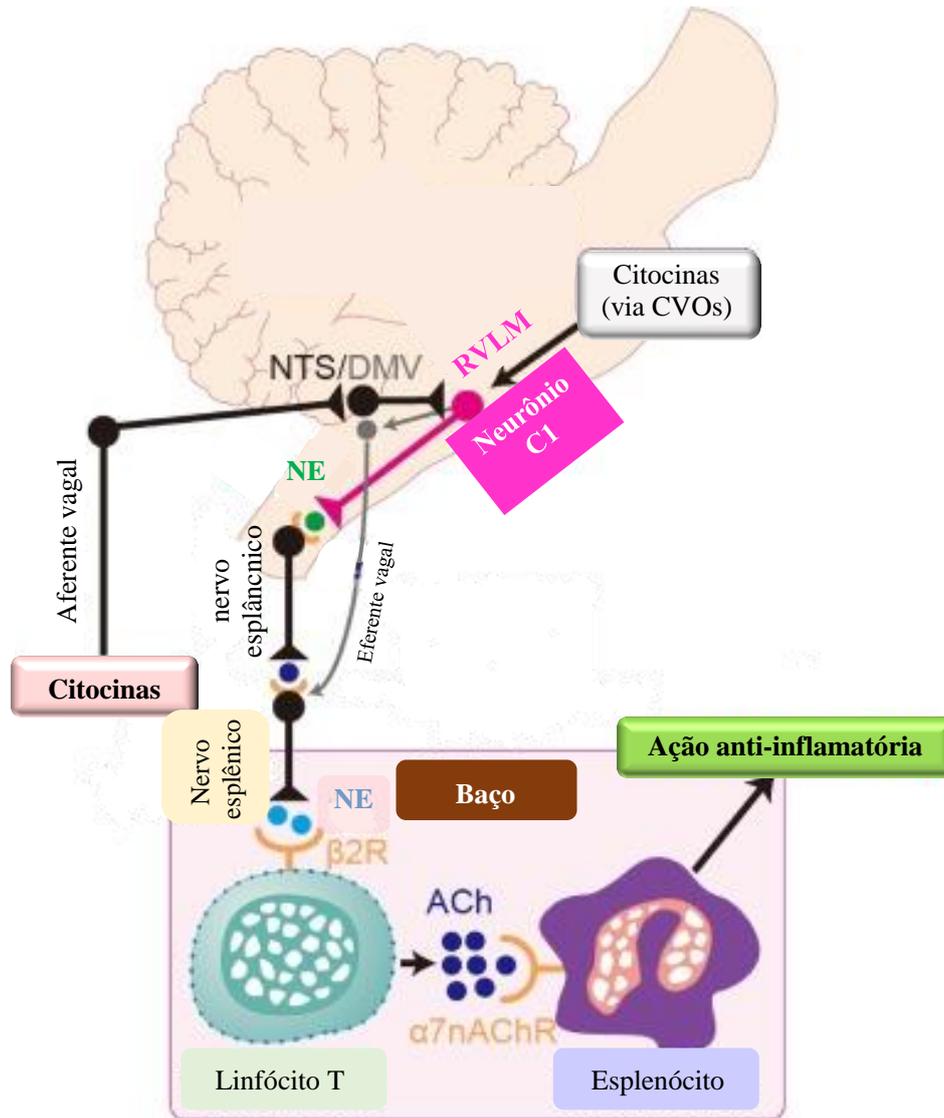


Figura 2. Esquema simplificado da via anti-inflamatória do reflexo inflamatório descrito anteriormente no texto acima. Adaptado de Abe e Inoue (2018).

De forma similar ao baço, o fígado também é inervado pelos componentes neurais simpáticos do reflexo inflamatório que modulam a secreção de mediadores inflamatórios, com destaque para a produção de $\text{TNF-}\alpha$ (MARTELLI et al., 2014; PAVLOV; TRACEY, 2017). Além disso, estudos recentes também demonstram a importância da via eferente colinérgica (vagal) e do receptor $\alpha 7\text{nAChR}$ s na regulação da produção de mediadores inflamatórios pelas células de *Kupfer* (HAJIASGHARZADEH; BARADARAN, 2017; METZ; PAVLOV, 2018).

Além dos órgãos viscerais descritos, o tecido adiposo também é modulado pela inervação simpática. Achados iniciais notaram uma densa inervação simpática no tecido adiposo, em especial no tecido adiposo marrom (BAT, do inglês *brown adiposo tissue*) (DICULESCU; STOICA, 1970). O BAT é um dos principais componentes do PVAT,

localizado ao redor dos vasos sanguíneos, com exceção dos vasos sanguíneos cerebrais. Ainda em relação ao PVAT, Watts et al. (2011) observaram a presença de catecolaminas, incluindo NE e adrenalina. Entretanto, a função exata da inervação simpática no PVAT ainda não está bem elucidada, entretanto, achados recentes sugerem que a inervação simpática possa atuar modulando a liberação de mediadores pró-inflamatórios e regulando a função vascular (SAXTON; WITHERS; HEAGERTY, 2019).

O PVAT, além de ser composto por adipócitos, possui diferentes componentes celulares dependendo do leito vascular, dentre os quais se destacam os linfócitos e macrófagos (GAO, 2007). Por essa razão, o PVAT é responsável pela liberação de grande variedade de mediadores pró e anti-inflamatórios, tais como adipocinas (TNF- α e IL-10) (OUCHI et al., 2011), que possuem efeitos parácrinos que modulam a estrutura e função vascular. Em modelos experimentais de obesidade, estudos constataram modificações na estrutura do PVAT, tornando-o disfuncional e em desequilíbrio com a imunidade inata, resultando na intensificação do perfil pró-inflamatório das células fagocíticas que o compõem (GAO et al., 2005; FÉRNANDEZ-ALFONSO et al., 2013). Na endotoxemia, a síntese elevada de citocinas pró-inflamatórias no PVAT medeia alterações hemodinâmicas através da liberação de mediadores inflamatórios secundários, como o NO (HAI-MEI et al., 2013).

O NO é um gás sintetizado a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina pelas isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MACHADO et al., 2004). Existem pelo menos três isoformas de NOS: as enzimas nNOS (neuronal) e eNOS (endotelial) conhecidas como constitutivas, que produzem e liberam NO em quantidade nanomolar por curto período de tempo, e a iNOS produz e libera grandes quantidades de NO, na ordem de micromolar, durante longos períodos de tempo quando comparada às NOS constitutivas, e geralmente está associada aos efeitos citotóxicos e às ações que promovem as patologias vasculares (ALDERTON et al., 2001). No contexto inflamatório, a intensa produção de NO pela ativação da iNOS, em diversos tipos celulares, leva à depressão na função cardiovascular e na reatividade vascular às catecolaminas, resultando em hipotensão e redução da sobrevivência de ratos endotoxêmicos (HALLEMEESCH et al., 2003; CÁRNIO et al., 2005; STABILE et al., 2007, 2010; CHEN et al., 2010).

No entanto, apesar de descrita a importância do sistema simpático no controle da resposta imune, os estudos avaliando as vias neurais eferentes na regulação da inflamação sistêmica são recentes e necessitam ser melhor elucidados. Nesse sentido, novas estratégias e drogas anti-inflamatórias estão sendo utilizadas para melhor compreender as ações do reflexo inflamatório na endotoxemia.

A ativação do eixo Ang-(1-7)/ Mas receptor tem sido considerada uma importante estratégia anti-inflamatória em diversos modelos experimentais (SILVEIRA et al., 2010; SOUZA; COSTA-NETO, 2012; REGENHARDT et al., 2013; TSAI et al., 2018; XIAO et al., 2018).

A Ang-(1-7) (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷), foi identificada por Santos et al. (1988), a partir clivagem da angiotensina I pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Um ano depois, Chappell et al. (1989) identificaram a presença desse peptídeo em cérebro de ratos. Ainda no mesmo ano, Campagnole-Santos et al. (1989) descreveram o primeiro efeito da administração de Ang-(1-7) no NTS de ratos anestesiados. A partir desses achados, a Ang-(1-7) foi então denominada como sendo um peptídeo biologicamente ativo do sistema renina angiotensina (SRA) (SANTOS et al., 2005; FERRARIO, 2006; BADER, 2010). Atualmente, são conhecidas três vias metabólicas pelas quais a Ang-(1-7) é formada: (1) diretamente a partir da clivagem da ligação Pro⁷-Phe⁸ da angiotensina I por endopeptidases (por exemplo, endopeptidase neutra e prolil-endopeptidase); (2) a partir da clivagem da Phe⁸ da angiotensina II pela prolilendopeptidase e carboxipeptidases (prolil-carboxipeptidase e ECA2, uma enzima homóloga à ECA); e (3) a partir da clivagem da His⁹ da angiotensina-(1-9) pela endopeptidase neutra e pela ECA (SANTOS; FERREIRA; SIMOES, 2008; XU; SRIRAMULA; LAZARTIGUES, 2011).

Santos et al. (2003) identificaram o receptor Mas como um receptor funcional e mediador das ações biológicas da Ang-(1-7). A ação do heptapeptídeo nesse receptor pode ser constatada pela utilização do antagonista seletivo D-Ala⁷-Ang-(1-7), (A-779), ressaltando que este composto não apresenta atividade agonista intrínseca em várias preparações biológicas testadas.

A imunomarcagem da Ang-(1-7) (KROB et al., 1998) e de seu receptor (BECKER et al., 2007) ao longo do encéfalo sugere que, células de diversas regiões do cérebro podem ser moduladas por este peptídeo. Adicionalmente, a identificação do receptor Mas em áreas como RVLM e NTS, reforçam as evidências sobre a participação da Ang-(1-7) na modulação da pressão arterial (PA) e da atividade de neurônios simpáticos. No SNC, a microinjeção de Ang-(1-7) no RVLM de ratos anestesiados produz aumento da PA, sem alterar a frequência cardíaca (FC) (SILVA et al., 1993; FONTES et al., 1997), enquanto a microinjeção de Ang-(1-7) no PVN intensificou a excitabilidade de neurônios simpáticos na região, sendo esse efeito bloqueado pelo A779 (YU et al., 2019). O estudo recente de Bilodeau e Leiter (2018), além de confirmar o efeito pressor, demonstrou a intensificação da atividade do nervo

esplâncnico após a administração central de Ang-(1-7) e A779 no RVLM de ratos anestesiados. Esses achados indicam a ação neuromodulatória da Ang-(1-7) no SNC, e por essa razão, a Ang-(1-7) é apontada como um peptídeo promissor em diversos contextos experimentais.

No contexto inflamatório, o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas atenua a produção de mediadores inflamatórios e a mortalidade induzidas pelo LPS (SOUZA et al., 2014; LI et al., 2015; EL-SHOURA et al., 2018; JIANG et al., 2019), entretanto, os mecanismos não estão totalmente elucidados. Assim, considerando que esse heptapeptídeo atua com um neuropeptídeo central protetor (GIRONACCI et al, 2013), e dada a importância das vias neurais na regulação do sistema imune, a hipótese do presente estudo é que a administração central de Ang-(1-7) promova um efeito anti-inflamatório periférico através da modulação simpática eferente do reflexo inflamatório no modelo endotoxêmico (Figura 3). Além disso, não há trabalhos publicados demonstrando o papel da Ang-(1-7) na regulação neural do sistema imune durante a endotoxemia, o que justifica a realização do presente estudo.

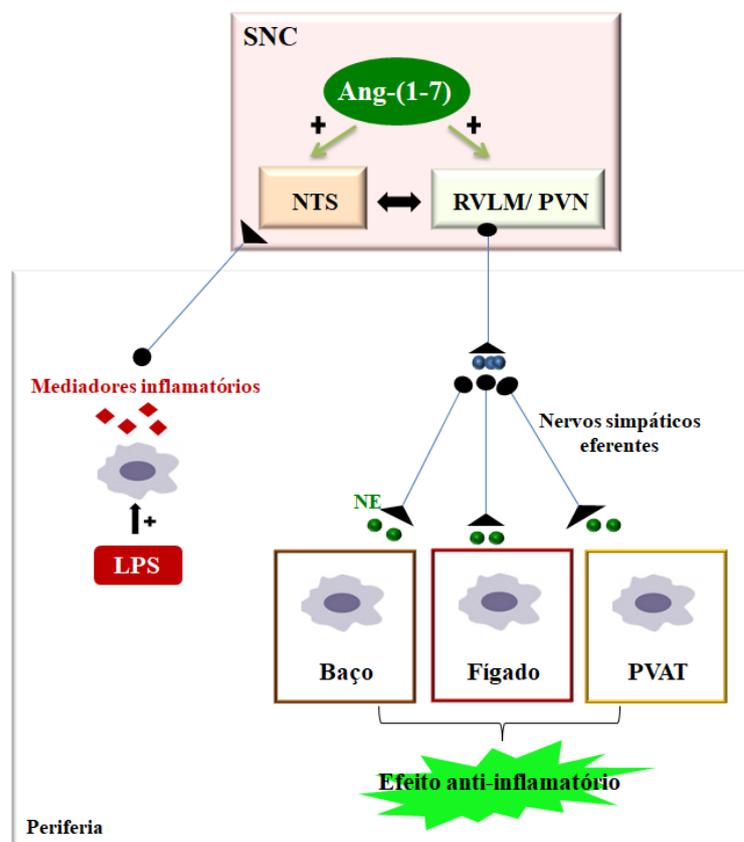


Figura 3. Hipótese do presente estudo onde se infere o efeito anti-inflamatório sistêmica da Ang-(1-7) através da ativação do componente simpático eferente do reflexo inflamatório na endotoxemia.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar se a Ang-(1-7) pode modular a resposta inflamatória nos ratos endotoxêmicos, via mecanismo central, e se esse efeito é mediado pelo componente simpático eferente do reflexo inflamatório.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos *Wistar* e adultos (215–220 g) obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas (40 x 32 x 17 cm), sendo três animais por caixa, expostos ao ciclo claro-escuro de 12 h (luz das 7:00 - 19:00 h), temperatura controlada (25 ± 2 °C). Os animais receberam ração comercial balanceada (Nuvilab CR-1; Nuvital, Colombo, PR, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – EERP/USP (Protocolo nº 14.872.53.4) e performados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Drogas utilizadas

Ang-(1-7) (Angiotensin Fragment 1-7 acetate salt hydrate; A9202), 6-OHDA (6-Hydroxydopamine hydrochloride; H4381), LPS (*Escherichia coli* serotype O111:B4), NE [L-(-)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt monohydrate; A9512], L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; N5751), tetraetilamônio (tetraethylammonium - TEA; 86616), aminoguanidina (Aminoguanidine hydrochloride; 396494), AVP [(Arg8)-Vasopressin acetate salt; V9879] ácido ascórbico (L-Ascorbic acid; A92902); 4-(6-Acetoxy-methoxy-2,7-dichloro-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'(ethylenedioxy)dianiline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl) ester (Fluo-3AM; 73881); 4,5-Diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA; D225); e o corante Evans blue (E2129) foram obtidos da Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO, USA), enquanto o A779 [((D-Ala⁷)-Angiotensin I/II (1-7) trifluoroacetate salt; H-2888) foi obtido da Bachem (Bubendorf, Switzerland). Ang-(1-7), A779, LPS, NE, L-NAME, aminoguanidina, TEA e AVP foram dissolvidos em salina estéril 0.9% (Aldrich, Milwaukee, Wis), e a 6-OHDA foi dissolvida em solução de ácido ascórbico 10 %.

3.3 Procedimentos cirúrgicos

3.3.1 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Para a realização da cirurgia de implantação de cânula-guia no ventrículo lateral direito, os animais foram anestesiados, intraperitonealmente (ip) com Ketamina e Xilasina (90 mg/kg e 9 mg/kg, respectivamente). Após a anestesia, de acordo com as coordenadas do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2004), foi implantada uma cânula-guia (0.6 mm de diâmetro externo e 10 mm de comprimento) no ventrículo cerebral lateral direito para as microinjeções intracerebroventriculares (icv) (ântero-posterior = -1.6 mm posterior ao bregma; latero-lateral = -1.5 mm, lateral em relação à linha mediana; dorso-vental = -2.5 mm, a partir da calota craniana). A cânula foi fixada ao crânio com acrílico auto-polimerizável e vedada com um mandril de aço inoxidável, com o objetivo de evitar uma eventual obstrução. Após a cirurgia, os animais permaneceram em recuperação em caixas plásticas individuais (738 cm² e tampa aramada) acondicionadas em estante ventilada (25 ± 2 °C) por um período de sete dias. Após esse período, os animais foram submetidos à cirurgia da canulação da veia jugular externa.

3.3.2 CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR

Um dia antes do início dos protocolos experimentais, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilasina (90 mg/kg e 9 mg/kg, respectivamente, ip) para a canulação da veia jugular externa. Uma incisão longitudinal de 1 cm foi feita na superfície ventral do pescoço, a 1 cm da traquéia. A veia foi exposta, separada dos tecidos conectivos e amarrada. Uma cânula de silicone (Silastic®, Dow Corning CO, Midland, MI, EUA, com 11 cm de comprimento, e com 0.51 mm e 0.94 mm de diâmetro interno e externo, respectivamente) foi introduzida na veia e presa por linhas de sutura. A porção livre da cânula foi transpassada por baixo da pele, e exteriorizada no dorso do animal. Todas as incisões foram fechadas com linha de sutura estéril.

3.3.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL

No mesmo dia, após o procedimento de canulação da veia jugular, os animais tiveram a artéria femoral direita canulada. Com o animal ainda anestesiado, foi realizada uma incisão de 1 cm na região inguinal direita para exposição da artéria femoral. Um cateter de polietileno (PE), constituído por um seguimento de PE-10 (4,5 cm de comprimento), ligado a um cateter de PE-50 (15 cm) foi colocado na artéria femoral, atingindo a aorta abdominal. A extremidade livre do cateter foi exteriorizada e fixada na área intraescapular do animal. A cânula foi

prontamente heparinizada (125 UI/ml). Após a cirurgia, os animais permaneceram nas caixas individualizadas até a recuperação completa.

3.3.4 SIMPATECTOMIA QUÍMICA

Após o período de recuperação da canulação da veia jugular, os ratos receberam uma injeção ev de 6-OHDA (100 mg/Kg). A dose ev de 6-OHDA utilizada foi baseada em estudos descritos na literatura (MINSON et al., 1986; STOCKER et al., 2006). Após a administração da droga, os ratos foram mantidos em caixas individuais com livre acesso à ração e água, por 24 h, até o início dos protocolos experimentais.

3.4 Protocolos de administração das drogas

As doses de Ang (1-7) (0.3 nmol em 2 µL, icv) e A779 (3 nmol em 2 µL, icv) utilizadas no presente estudo foram baseadas nos trabalhos realizados por Mahon et al. (1995) e Oliveira; Campagnole-Santos e Santos (2013). Enquanto à dose de LPS, *in bolus*, (1.5 mg/kg) foi selecionada com base nos resultados prévios realizados em nosso laboratório (CÁRNIO et al., 2005; STABILE et al., 2007, 2010).

Os ratos foram randomicamente separados nos diferentes grupos experimentais de acordo com as drogas recebidas. As drogas foram administradas nos animais, isoladas ou combinadas, de acordo com o protocolo experimental e na seguinte ordem cronológica:

- (a) 6-OHDA ou solução de ácido ascórbico (10 %) foi injetada na veia jugular 24 h antes do A779 e/ou Ang-(1-7);
- (b) A779 foi administrado no ventrículo lateral direito 30 min antes da Ang-(1-7);
- (c) Ang-(1-7) foi injetada no ventrículo lateral 1 min antes da administração ev de LPS;
- (d) LPS foi injetado sistemicamente após a administração central de Ang-(1-7).
- (e) Os animais do grupo controle receberam um volume equivalente de salina isotônica (0.9 %) através das mesmas vias de administração e tempo descritos anteriormente.

3.5 Protocolos experimentais

3.5.1 PROTOCOLOS *IN VIVO* E *EX VIVO*

A fim de demonstrar, de forma didática, a divisão dos grupos experimentais de acordo com os protocolos *in vivo* e *ex vivo* avaliados, foram montados esquemas simples que serão apresentados logo abaixo (Figuras 4-11).

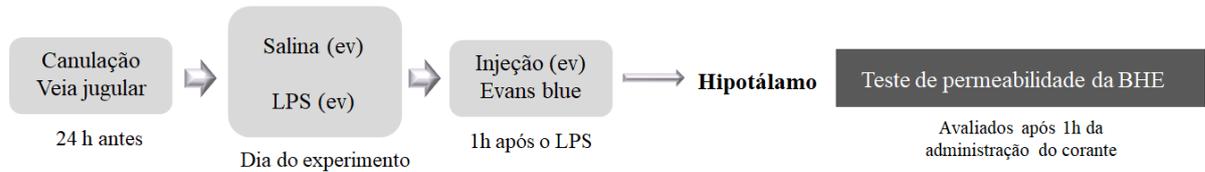


Figura 4. Esquema simplificado 1 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.

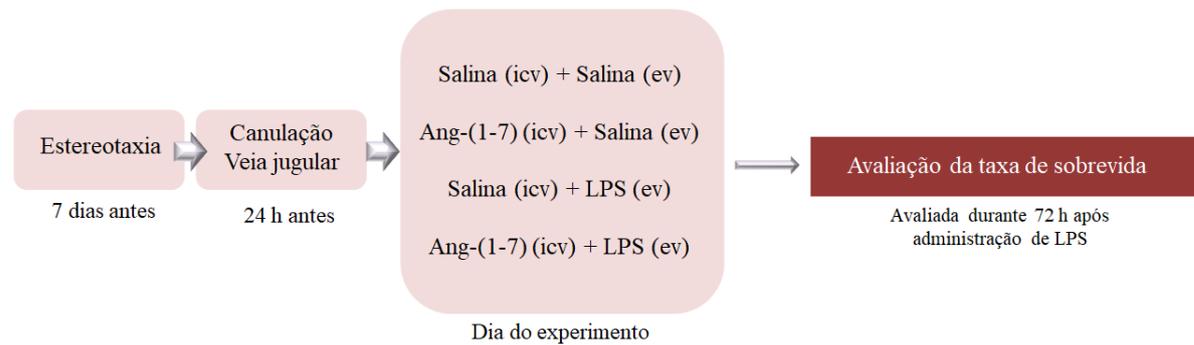


Figura 5. Esquema simplificado 2 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.

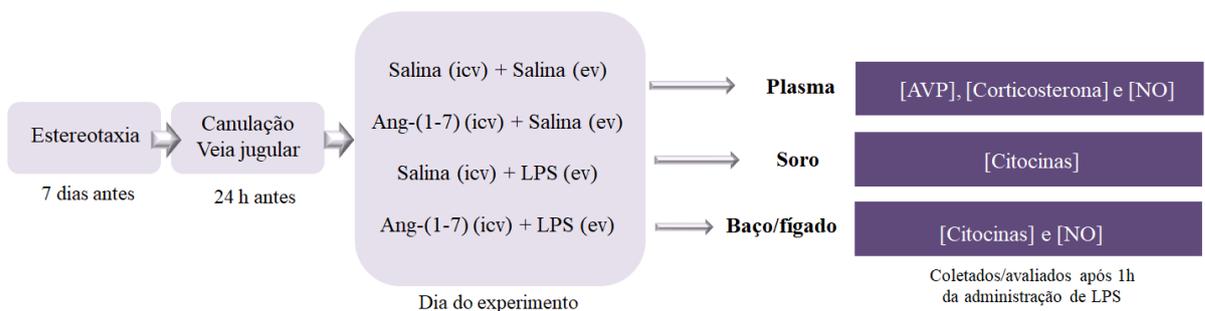


Figura 6. Esquema simplificado 3 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.

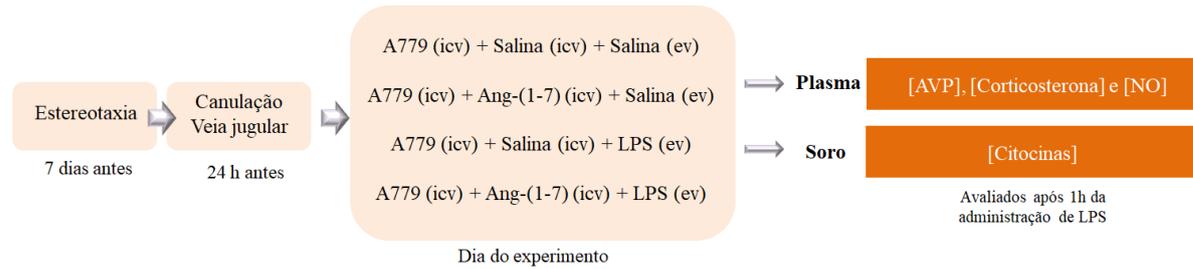


Figura 7. Esquema simplificado 4 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.

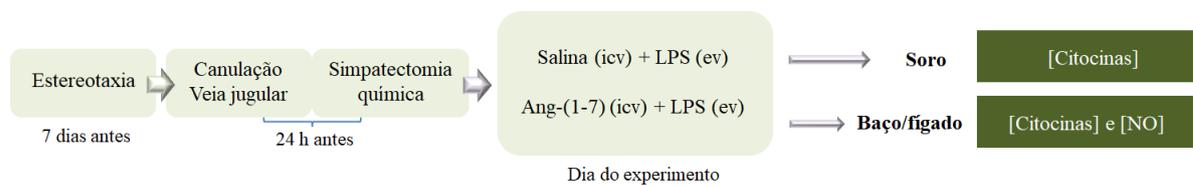


Figura 8. Esquema simplificado 5 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.

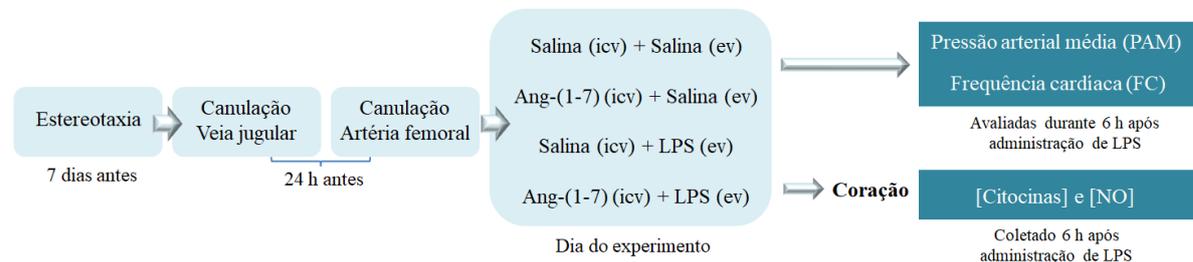


Figura 9. Esquema simplificado 6 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e técnicas implementadas no presente estudo.

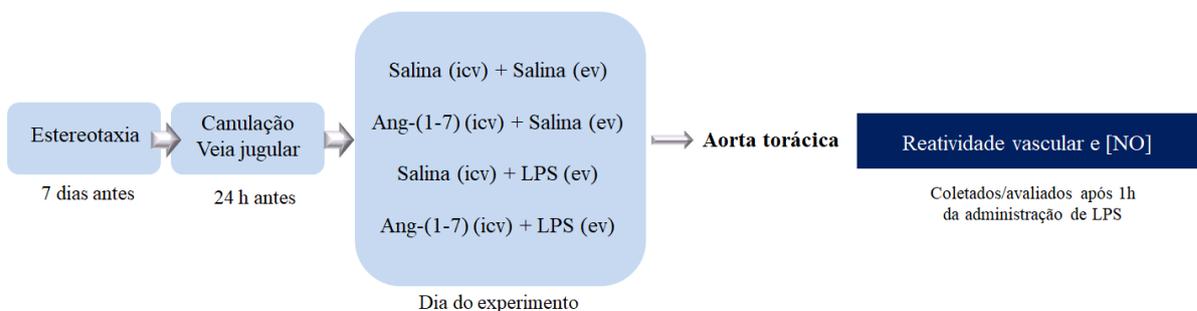


Figura 10. Esquema simplificado 7 dos procedimentos cirúrgicos, divisão em grupos experimentais, obtenção das amostras e para avaliação, *ex vivo*, da reatividade vascular realizada no presente estudo.

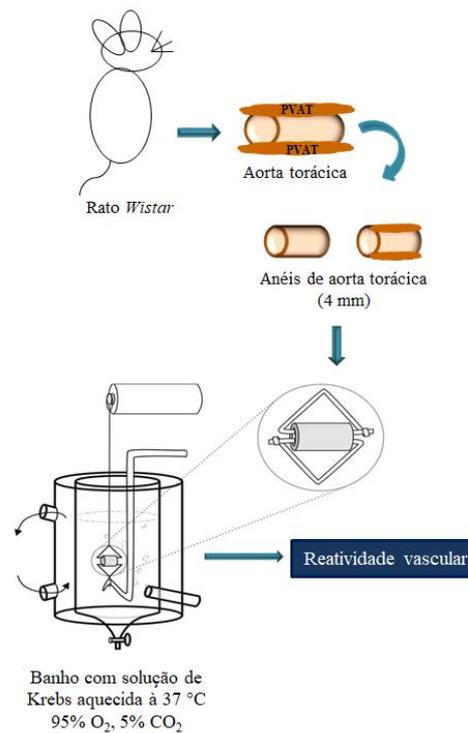


Figura 11. Esquema simplificado da obtenção dos anéis de aorta torácica (com e sem PVAT) para avaliação, *ex vivo*, da reatividade vascular.

3.5.2 PROTOCOLOS *IN VITRO*

3.5.2.1 CULTURA DE CÉLULAS DA MUSCULATURA LISA VASCULAR

Inicialmente, o PVAT da artéria aorta torácica dos ratos *Wistar* foram removidas e mantidas, por 30 min, em 1 mL de solução de Krebs (composição, em mmol/L: NaCl 130.0; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 14.9; C₆H₁₂O₆ 5.5; CaCl₂ 1.6), pH 7.4, aquecida a 37 °C e suprida com a mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂). Após esse período, a solução de Krebs foi renovada e deu-se início às estimulações com NE e/ou LPS por 1 h. Depois do tempo de estimulação, a solução de Krebs contendo o produto da estimulação do PVAT foi coletada e denominada como “produto do PVAT”. Essas soluções foram utilizadas como estímulo na cultura de VSMC (Figura 12) e também foram coletadas para a mensuração de TNF- α e NO_x.

A cultura de VSMC da aorta torácica de ratos *Wistar* utilizada nesse estudo foi, generosamente, fornecida pelo laboratório da Prof^a Dr^a Lusiane Maria Bendhack. A cultura primária de VSMC foi obtida como descrito no trabalho de Chi et al. (2017). Foram utilizadas as células nas passagens 4-5 (P4-P5).

Utilizando a cultura de VSMC foram realizados protocolos de estimulação, conforme demonstrado na figura 12, para a avaliação dos efeitos do LPS e/ou da NE na produção de mediadores inflamatórios e seu efeito sobre a contratilidade vascular. Antes do início dos protocolos de estimulação, as VSMC (10^4 células/poço) foram incubadas com as probes fluorescentes DAF ($5 \mu\text{mol/L}$) e Fluo-3AM ($10 \mu\text{mol/L}$) por 30 min.

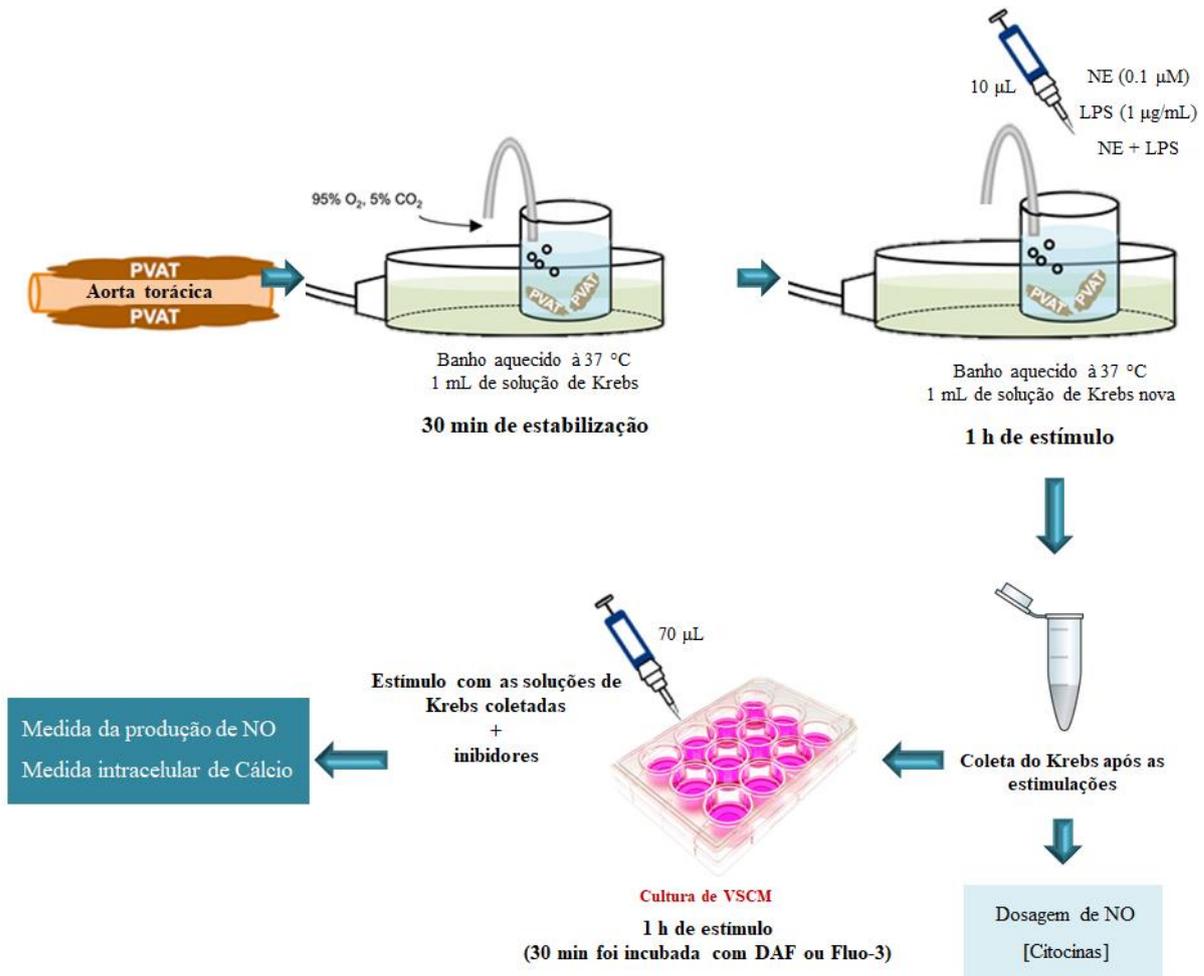


Figura 12. Esquema simplificado do protocolo de obtenção do PVAT e de seu produto, que foi utilizado como estímulo, *in vitro*, das VSMC, para avaliação da produção de mediadores inflamatórios e função vascular. Adaptado de Lee et al. (2014).

3.5.2.2 CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Quatro dias antes da coleta dos macrófagos, cada rato recebeu uma injeção *ip.* de 10 mL de meio tioglicolato a 3%. O tioglicolato permite a migração e a ativação dos macrófagos para a cavidade abdominal (COHN, 1978). No dia da coleta, os ratos foram decapitados e imediatamente imersos em etanol 96% para evitar a contaminação durante a coleta do lavado peritoneal. A seguir, a pele foi cortada para a exposição do abdômen e foi injetado um volume

de 10 mL de meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, código R8758). O abdômen foi massageado delicadamente e, o meio anteriormente injetado foi aspirado. O material colhido de, pelo menos, 5 animais foi centrifugado a 1200 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensão em 5 mL do meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich, código A2153), 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. A suspensão de células foi corada com corante de Turck e contada em câmara de Neubauer, para a quantificação do número de células por mL. A partir daí, foi pipetado o volume correspondente ao número de 10^6 células em cada poço de uma placa de cultura contendo 24 poços. A placa foi incubada em estufa a 37 °C com atmosfera umidificada e com 5 % de CO₂, durante 2 h para a adesão dos macrófagos. Após esse período, as células não aderidas foram removidas por lavagem (com agitação) com meio RPMI aquecido. Após a obtenção dos macrófagos peritoneais, foram realizadas as estimulações com LPS (1 µg/mL) e/ou NE (0.1 µM). Após 24 h dos estímulos, o sobrenadante foi coletado para posterior dosagem de TNF- α e as células foram coletadas para a análise da expressão proteica de iNOS.

3.6 Obtenção das amostras

As amostras de sangue foram obtidas do tronco pela decapitação do animal após 1 h da administração de LPS. O sangue total foi coletado em dois tubos falcon, sendo eles com ou sem anticoagulante. Assim, parte do sangue foi coletado com EDTA (1 mM) e imediatamente centrifugado (3100 rpm, 4 °C, 15 min) para a obtenção do plasma. A outra porção do sangue foi mantida no gelo até a coagulação e após esse processo, foi centrifugada (3500 rpm, 4°C, 10 min) para a obtenção do soro. Após coletados, plasma e soro foram armazenados em freezer à -80 °C até o momento das análises.

Em relação aos tecidos (fígado, baço, coração e aorta torácica), após o término dos respectivos protocolos de administração de drogas, foram coletados, lavados com salina estéril (0.9 %), congelados em gelo seco e armazenados em freezer à -80 °C até a homogeneização.

3.6.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TECIDUAL DE PROTEÍNA

É importante salientar que todas as técnicas, que serão descritas abaixo, que utilizaram tecidos homogeneizados foram corrigidas pela concentração de proteína das respectivas amostras. A concentração tecidual de proteína foi determinada através do método de Lowry

utilizando o kit comercial da BioRad (DC™ Protein Assay Kit, catálogo #500-0114 e #500-0113) e curva padrão de albumina (2 – 0.125 mg/mL).

3.7 Técnicas

3.7.1 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

Após o protocolo de administração de drogas, conforme observado na figura 4, os animais foram mantidos em caixas plásticas isoladas e observados por 72 h. A taxa de sobrevida foi estimada pelo método de *Kaplan-Meier*. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevida.

3.7.2 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BHE

Conforme a figura 2, os animais receberam injeção endovenosa (veia jugular) de 1 ml do corante azul de Evans 2% diluído em solução salina 0.9 %. O corante forma um complexo com a albumina sérica, originando compostos com peso molecular superiores a 60 kDa, que em condições normais não atravessam a BHE. Após a administração do corante, esperou-se 1 h e então os animais foram perfundidos com 200 mL solução salina. Os cérebros foram retirados e o hipotálamo removido. O hipotálamo foi homogeneizado em 200 µl de ácido tricloroacético 50%. As amostras foram centrifugadas (10000 rpm, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi diluído em etanol na proporção 1:1 (v/v). A mensuração da absorbância do corante azul de Evans foi realizada através de espectrofotometria (SynergyH1, BioTek), com leitura em 630 nm. Para a determinação da concentração do corante no tecido foi utilizada uma curva padrão com diluições seriadas da solução estoque do corante (100 – 0,78 ng/ml). Os dados foram expressos em $\text{pg} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

3.7.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA E TECIDUAL DE CITOCINAS POR ELISA

Os tecidos (fígado, baço e coração) foram homogeneizados com tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate-buffered saline* – PBS, pH 7.4) contendo inibidores de protease (AMRE-M250, Amresco), centrifugados (10000 rpm, 4 °C, 10 min) e foi coletado o sobrenadante. Os sobrenadantes (tecidos e cultura de macrófago), o soro e o “produto do

PVAT” foram diluídos com tampões apropriados, de acordo com o fabricante. Os ensaios foram determinados por ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) através da utilização de kits comerciais. A concentração sérica e tecidual de IL-1 β (catálogo # RLB00), IL-6 (catalogo # R6000B) e IL-10 (catálogo # R1000) foi obtida utilizando-se kits da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), enquanto a concentração de TNF- α foi determinada utilizando-se o kit da Biolegend (San Diego, CA, USA), de acordo com os manuais dos fabricantes. O resultado da concentração sérica foi expresso em pg·mL⁻¹ e o da concentração tecidual em pg·mg proteína⁻¹ com base nas curvas-padrão de cada kit.

3.7.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA E TECIDUAL DE NITRATO/NITRITO (NO_x)

Os tecidos (fígado, baço e aorta com PVAT) foram homogeneizado com PBS, contendo inibidor de protease, e centrifugados (10000 rpm, 4 °C, 10 min) para a coleta do sobrenadante. 50 μ L do sobrenadante, do plasma e do “produto do PVAT” foram desproteinizados com 100 μ L de Etanol absoluto a 4 °C, em sequência foram agitados e mantidos à -20 °C por 30 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (10000 rpm, 5 min, 25 °C) e o sobrenadante foi coletado. Foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO. USA). O volume de 5 μ L de amostra foi injetado na câmara de reação do analisador contendo o agente redutor 0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl à 95°C (para determinação de nitrato) ou com o agente redutor 1 % de Nal em ácido acético (para determinação de nitrito). O resultado da concentração sérica do NO_x foi expresso em μ g·mL⁻¹ e o da concentração tecidual em μ g·mg proteína⁻¹ com base na curva-padrão do ensaio.

3.7.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE AVP E CORTICOSTERONA

As concentrações séricas de AVP e corticosterona foram determinadas por radioimunoensaio (RIE) conforme descrito por Vecsei (1979). Essas dosagens foram devidamente realizadas no laboratório do Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues e da Prof^a Dra. Lucila Leico K. Elias. Para a determinação de AVP, amostras de 50 μ L de plasma foram extraídas utilizando o método de acetona/éter de petróleo, liofilizadas e armazenadas à -20 °C.

A determinação de corticosterona foi obtida em 25 μL de plasma que também foi extraído seguindo o método de acetona/éter de petróleo, liofilizado e armazenado à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização do RIE. A sensibilidade do ensaio e o coeficiente de variação intra e interensaio foram 0.1 pg/mL , 3.7 % e 7.4 % para AVP e 0.4 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, 3.3 % e 10.0 % para corticosterona. Os resultados foram expressos como pg mL^{-1} para AVP e como $\mu\text{g.dL}^{-1}$ para corticosterona.

3.7.6 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FC NOS RATOS NÃO ANESTESIADOS

Após o período de recuperação das cirurgias de estereotaxia e canulação, anteriormente descritas, foi realizado o protocolo para a obtenção da PAM e FC. Inicialmente, a cânula da artéria femoral de cada rato foi conectada a um transdutor de pressão. Em seguida, foi permitido aos animais um período de estabilização de 45 min a 1 h para coleta dos valores basais. A aferição da PAM e FC ocorreu no período da manhã, tendo início entre 8 a.m e 9 a.m., e as medidas foram verificadas a cada 15 min após a administração de LPS (tempo zero) até a sexta hora. A obtenção dos dados deu-se através do sistema de aquisição de dados da BioPac Systems, Inc. MP-100 (Santa Barbara, Ca, EUA). Os dados obtidos foram registrados e analisados utilizando o programa AcqKnowledge 3.9.0 (BioPac Systems, Santa Barbara, Ca, EUA). Os resultados foram expressos como mmHg para a PAM e como batimentos por minuto (bpm) para os valores de FC.

3.7.7 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DA AORTA TORÁCICA

Após a decapitação dos ratos, a artéria aorta torácica de cada animal foi removida, dissecada e seccionada em anéis de 4 mm. Em alguns anéis o PVAT foi preservado (PVAT⁺), enquanto em outros, foi removido (PVAT⁻). Os anéis foram colocados em dois ganchos de aço inoxidável, conectados ao transdutor isométrico de força (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) e mantidos em uma câmara contendo solução de Krebs (composição, em mmol/L: NaCl 130.0; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 14.9; C₆H₁₂O₆ 5.5; CaCl₂ 1.6), pH 7.4, aquecida a 37 $^{\circ}\text{C}$ e suprida com a mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂). Cada anel foi tensionado para restaurar a tensão de 1.5 g e a preparação foi estabilizada por 1 h. Após a estabilização, os anéis foram estimulados com Fenilefrina (0.1 $\mu\text{mol/L}$) e a presença ou ausência de endotélio foi constatada pelo uso de Ach (1 $\mu\text{mol/L}$). Apenas os anéis com endotélio foram utilizados no estudo. Curvas cumulativas concentração-efeito foram

construídas para NE (0.1 nmol/L - 10 µmol/L) na presença ou ausência de L-NAME (100 µmol/L), TEA (100 µmol/L) e AVP (1 nmol/L). Os resultados foram expressos em gramas de contração.

3.7.8 DETERMINAÇÃO, *IN VITRO*, DO NO E DA $[Ca^{+2}]_i$

A produção de NO e a $[Ca^{+2}]_i$ foram determinadas por citometria de fluxo. Para as análises do NO e Ca^{+2} no citômetro foram utilizados as sondas DAF e Fluo-3AM, respectivamente. As análises citofluorogáficas foram realizadas utilizando o aparelho BectoneDickinson FACScan (San Jose, CA, USA). A primeira leitura no citômetro foi realizada para verificar a incorporação das sondas pelas VSMC e determinar a fluorescência basal. Após, os estímulos foram adicionados à cultura e novas leituras foram realizadas durante 30 min. Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência.

3.7.9 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE iNOS

A quantificação da expressão proteica da iNOS nos macrófagos peritoneais foi obtido através da técnica de *western immunoblotting*. Após 24 h do estímulo com LPS, os macrófagos foram extraídos usando tampão RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA e 1 % de NP-40), acrescido de coquetel com inibidores de proteases. O material homogeneizado foi lisado e foi determinada a concentração de proteínas totais.

Alíquotas de proteínas (10 µg) foram desnaturadas (95 °C por 4 min), separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-10 % (SDS-PAGE) (30 min à 70 V, 2 h à 120 V, ambos em 4° C) e transferidas (3 h em gelo) para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech). Foi utilizado o marcador padrão de peso molecular (BioRad, código: 1610375) para possibilitar a identificação e localização das bandas. As membranas contendo as amostras transferidas foram bloqueadas com TBS-T (50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 0.1 % Tween 20) contendo 5 % de leite em pó desnatado por 1 h à temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-iNOS (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-650) ou o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-β-Actina (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-47778). Subsequentemente, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 1 h à temperatura ambiente com os anticorpos

secundários anti-coelho IgG-HRP (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-358914) e anti-camundongo IgG-HRP (1:20000, Santa Cruz Biotechnology, catálogo: sc-2357). Após, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 2 min com o reagente ECL (BioRad, código: 1705061). As bandas foram visualizadas expondo a membrana ao filme fotográfico de raio-X em cassetes. A quantificação das bandas foi realizada usando o programa Image J. O resultado foi expresso como expressão proteica de iNOS/ β -Actina.

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 8.0 (GraphPad). As determinações de citocinas, NOx, corticosterona, AVP, bem como dos ensaios realizados *in vitro* foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Os dados de PAM e FC foram analisados por ANOVA-*two way* seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*. O ensaio de permeabilidade foi analisado pelo teste t de *Student* seguido pelo pós-teste de *Newman-Keuls*. A porcentagem de sobrevivida foi analisada pelo o método *Kaplan-Meier* e comparada pelo teste de log-rank. Para as análises de cada curva concentração-resposta, o efeito máximo (Emax) e o pD2 (-log EC50) foram calculados usando regressão não-linear. O n experimental refere-se ao número de animais utilizados em cada protocolo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 A administração sistêmica de LPS não alterou a permeabilidade da BHE no presente modelo experimental

O primeiro protocolo experimental realizado no presente estudo foi o de análise da permeabilidade da BHE. Para tal, foi utilizado o método de administração periférica e quantificação hipotalâmica do corante azul de Evans. Esse protocolo foi realizado a fim de verificar possíveis alterações na BHE que poderiam afetar na administração e ação central das drogas utilizadas no estudo. Como resultado, não constatamos diferenças na permeabilidade da BHE dos ratos endotoxêmicos em comparação com os animais do grupo controle (Salina + salina) após 2 h da administração do LPS (Figura 13).

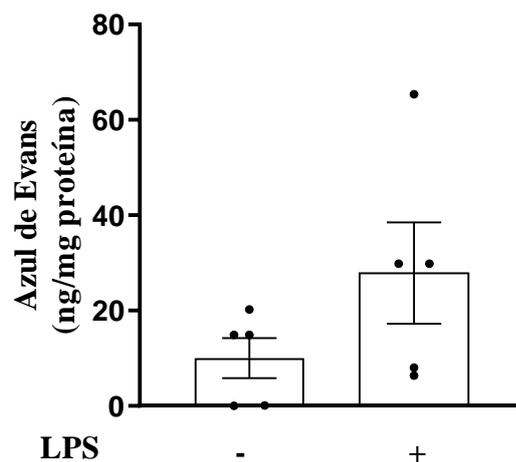


Figura 13. Avaliação da permeabilidade da BHE em ratos 2 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg). Valores expressos em média \pm SEM, n = 10 por grupo experimental.

4.2 A administração central de Ang-(1-7) eleva a taxa de sobrevivência dos animais endotoxêmicos

Acompanhamos o índice de mortalidade dos animais endotoxêmicos por 72 h e constatamos que a administração central de Ang-(1-7) foi capaz de restabelecer o percentual de sobrevivência dos animais expostos ao LPS (Figura 14).

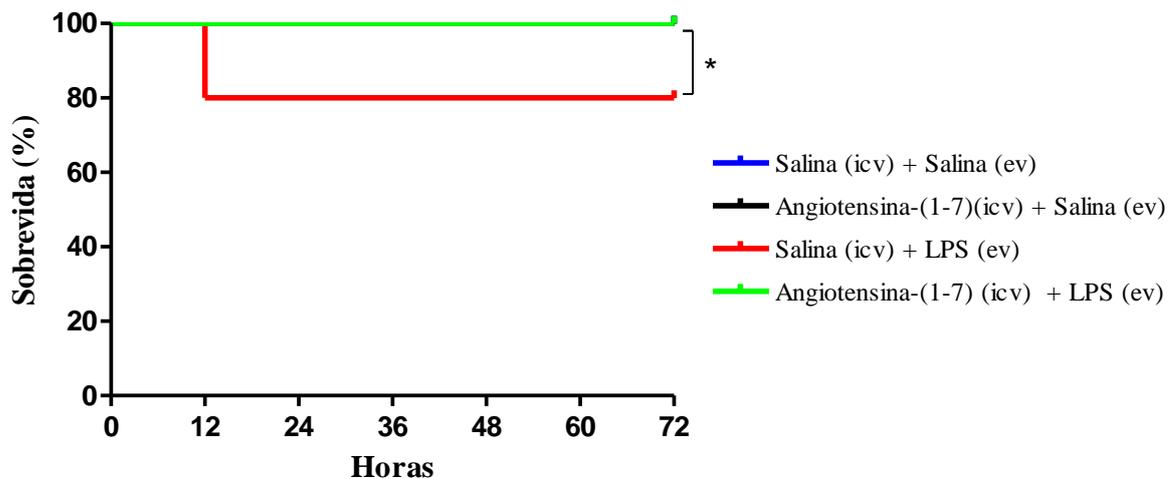


Figura 14. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) sobre o percentual de sobrevivência dos ratos submetidos à endotoxemia (1.5 mg/Kg) por 72 h. N = 10, valores expressos em porcentagem. *p < 0,05 *versus* respectivo grupo controle.

4.3 O eixo Ang-(1-7)/receptor Mas central exerceu efeito anti-inflamatório periférico através da modulação do componente neural simpático do reflexo inflamatório

Avaliamos a concentração sérica dos mediadores inflamatórios: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e NOx (Figura 16) a fim de constatar o potencial inflamatório da dose sistêmica de LPS utilizada em nosso modelo experimental. Nesse sentido, verificamos o aumento na concentração sérica de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e NOx dos ratos submetidos ao LPS por 1 h em comparação aos animais que só receberam salina [Salina (icv) + salina (ev)]. No entanto, a administração central da Ang-(1-7) atenuou a concentração sérica dos mediadores pró-inflamatórios e elevou a concentração de IL-10 nos animais submetidos à endotoxemia. Ademais, a resposta anti-inflamatória sistêmica da Ang-(1-7) foi bloqueada pelo uso do A779, sugerindo a participação do receptor Mas nesse efeito periférico (Figuras 15 A-D). Considerando a ação anti-inflamatória sistêmica do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas observada, a próxima etapa foi avaliarmos esse efeito imunomodulador na simpatectomia química. Ainda nas figuras 15 A-D e na figura 16, verificamos a reversão do efeito da Ang-(1-7) e a intensificação da resposta inflamatória nos animais endotoxêmicos. Também é importante salientar que não houve diferença entre os animais do grupo controle e aqueles dos grupos A779 + Salina + Salina e ODHA + ácido ascórbico 10% nas análises séricas de TNF- α (valores não detectados pelo kit comercial), IL-1 β (43.69 *versus* 38.75 e 40.50 pg/mL, respectivamente), IL-6 (53.41 *versus* 64.19 e 58.20 pg/mL, respectivamente), IL-10 (9.95

versus 8.48 e 10.19 pg/mL, respectivamente) e NOx (16.91 versus 19.96 e 17.21 μ M/mL, respectivamente) (dados não demonstrados nas figuras).

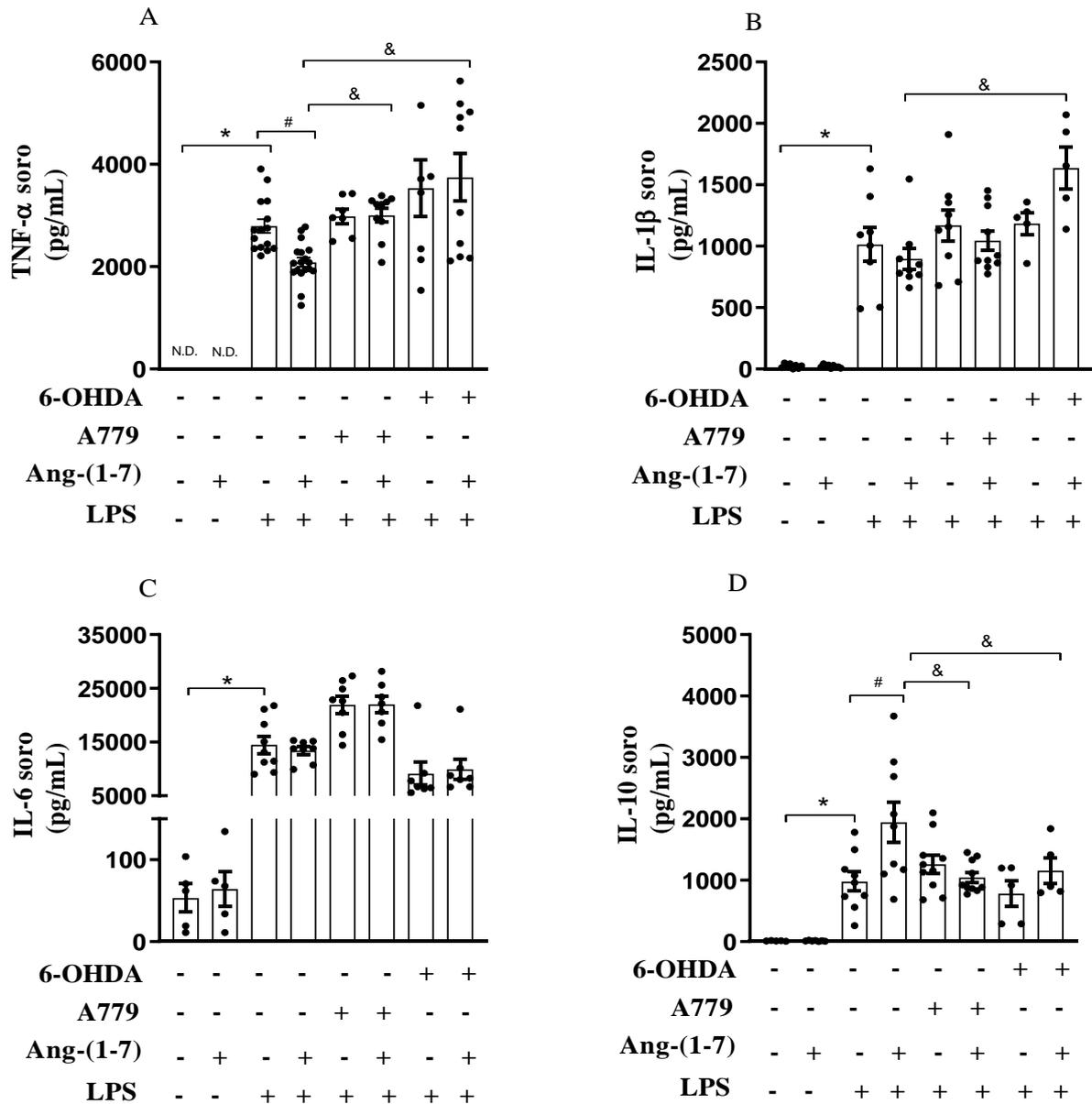


Figura 15. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) e A779 (3 nmol em 2 μ L) sobre a concentração sérica de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e simpatectomia química por 24 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 7-18. ND.: valor não detectável. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0.05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

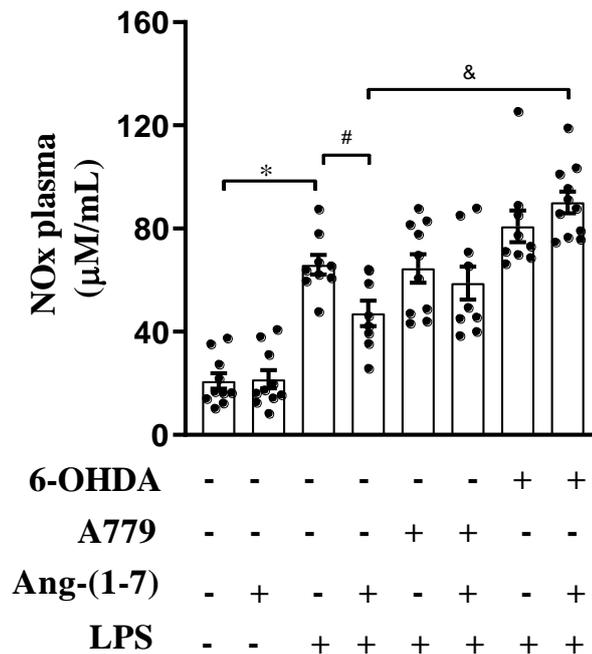


Figura 16. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) e A779 (3 nmol em 2 µL) sobre a concentração plasmática de NOx dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e simpatectomia química por 24 h. Valores expressos em média ± SEM, n = 7-18. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0,05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.4 A administração central de Ang-(1-7) reduziu a concentração tecidual de mediadores pró-inflamatórios através da modulação do componente neural simpático do reflexo inflamatório

O baço e o fígado são considerados importantes órgãos efetores do reflexo inflamatório. Assim, avaliamos a concentração tecidual de TNF- α , IL-10 e NOx, visto o importante efeito da Ang-(1-7) sobre esses mediadores inflamatórios na circulação sistêmica. Inicialmente, devemos constatar que não houve diferença estatística entre os animais do grupo controle e aqueles dos grupos A779 + Salina + Salina e ODHA + ácido ascórbico 10% nas análises de TNF- α (2.059 versus 1.50 e 1.74 pg/mg de proteína, respectivamente), IL-10 (22.01 versus 16.45 e 17.41 pg/mg de proteína, respectivamente) e NOx (12.38 versus 12.40 e 15.95 µM/mg de proteína, respectivamente) no baço, e de TNF- α (79.03 versus 78.62 e 77.66 pg/mg de proteína, respectivamente), IL-10 (64.01 versus 59.44 e 58.50 pg/mg de proteína, respectivamente) e NOx (7.60 versus 7.21 e 5.56 µM/mg de proteína, respectivamente) no fígado (dados não apresentados nas figuras abaixo).

Nota-se nas figuras 17 A-C que a administração central de Ang-(1-7) reduziu a inflamação no baço induzida pelo LPS e essa resposta foi abolida com a simpatectomia

química. O mesmo perfil de resposta foi observado no fígado onde a Ang-(1-7) central modulou o componente simpático do reflexo inflamatório e atenuou a inflamação nos ratos submetidos à endotoxemia (Figura 18 A-C).

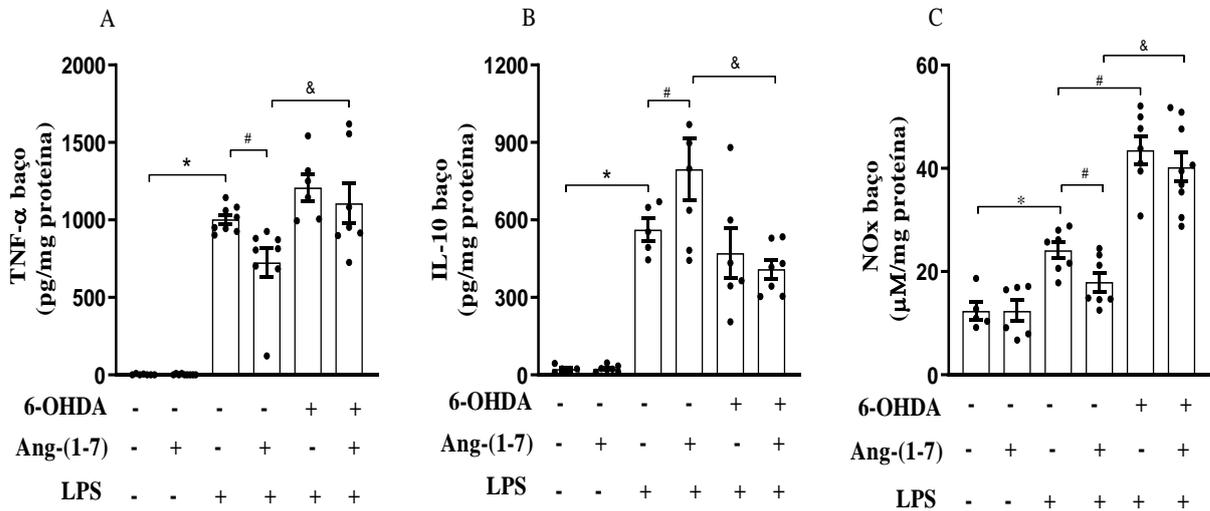


Figura 17. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) sobre a concentração de TNF- α (A), IL-10 (B) e NOx (C) no baço dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e simpatectomia química por 24 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 6-9. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, # p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0.05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

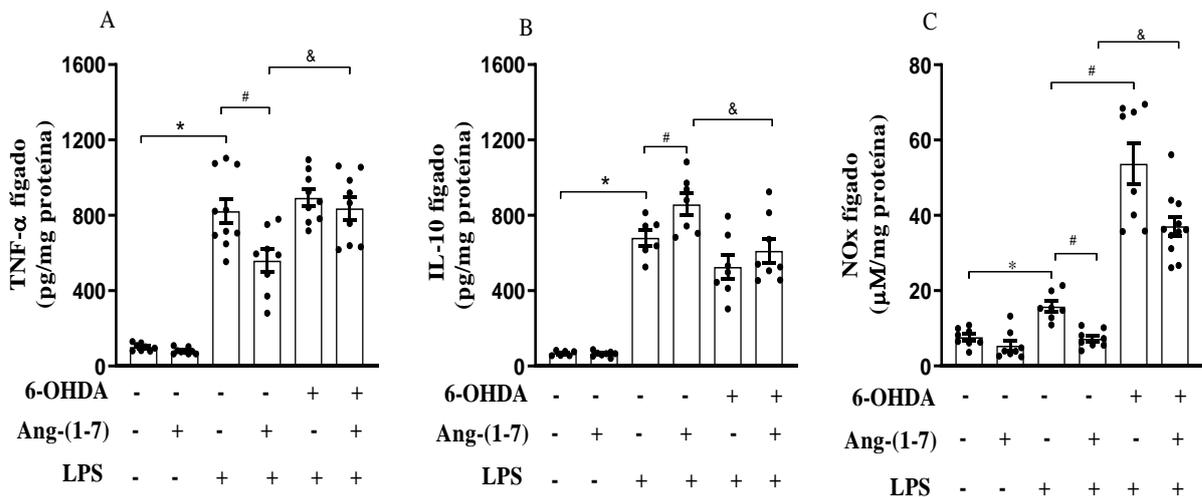


Figura 18. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) sobre a concentração de TNF- α (A), IL-10 (B) e NOx (C) no fígado dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e simpatectomia química por 24 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 8-10. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, # p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0.05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.5 A administração central de Ang-(1-7) não alterou as concentrações plasmáticas de corticosterona e AVP

Além do componente autonômico simpático, a via humoral destaca-se como importante eixo modulatório do sistema imune. Da via humoral há a regulação da resposta inflamatória através da liberação de corticosterona e AVP. Nesse sentido, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de corticosterona e AVP.

Conforme observado na figura 19, os animais que receberam LPS tiveram um aumento na concentração plasmática de corticosterona e AVP. Entretanto, a administração concomitante de Ang-(1-7) e A779 não alterou os níveis séricos desses hormônios nos ratos endotoxêmicos (Figura 19). Também é importante comentar que não houve diferença estatística entre os animais do grupo controle (Salina + Salina) e aqueles do grupo A779 + Salina + Salina na dosagem plasmática de corticosterona (14.88 *versus* 14.50 $\mu\text{g/dL}$, respectivamente) (dado não apresentado no gráfico abaixo).

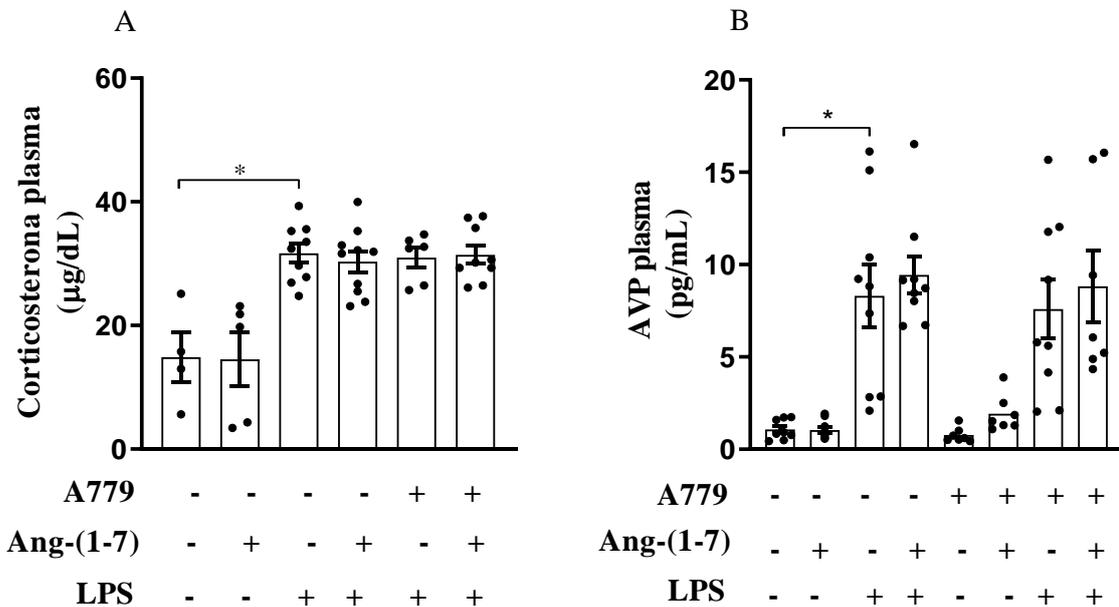


Figura 19. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μL) e A779 (3 nmol em 2 μL) sobre a concentração plasmática de corticosterona (A) e AVP (B) dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg). Valores expressos em média \pm SEM, n = 4-10. *p < 0,05 *versus* respectivo grupo controle. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

4.6 A administração central de Ang-(1-7) atenuou a hipotensão inicial induzida pelo LPS, sem afetar a FC

Os ratos submetidos à endotoxemia apresentaram hipotensão 1 h após a administração de LPS se comparados aos respectivos controles. A Ang-(1-7) central foi capaz de atenuar a resposta hipotensora, sem afetar a taquicardia, apresentada pelos animais endotoxêmicos (Figuras 20 A-B). Diante do resultado da FC apresentado (Figura 20B), avaliamos a concentração de TNF- α nos corações dos ratos após o término do protocolo de aferição da PAM e FC. Os animais que receberam Ang-(1-7) e LPS atenuaram a elevada concentração tecidual de TNF- α observada nos ratos endotoxêmicos (Figura 21).

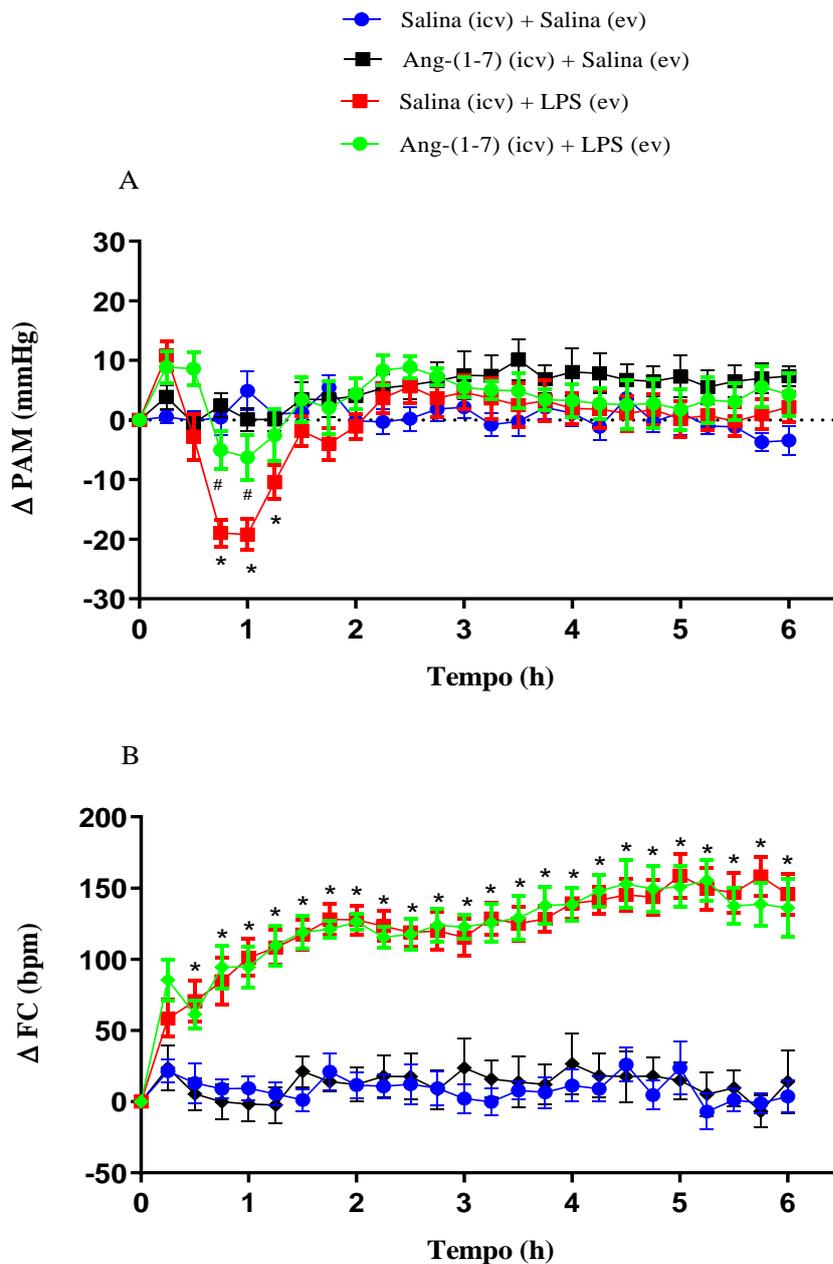


Figura 20. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) na PAM (A) e FC (B) dos ratos submetidos à endotoxemia (1.5 mg/Kg) ao longo de 6 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 5-7. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS. ANOVA-two way, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

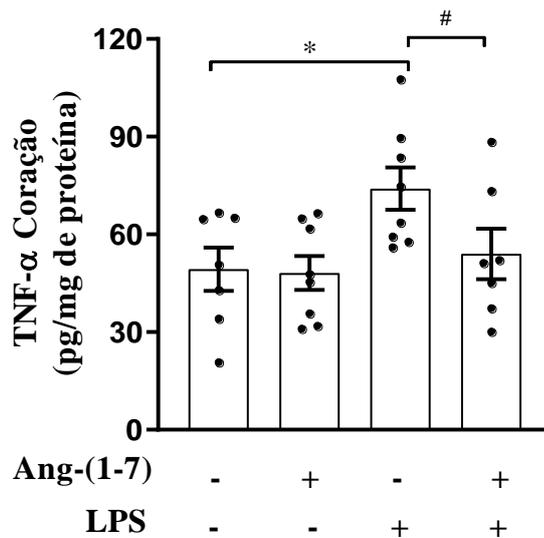


Figura 21. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) sobre a concentração de TNF- α no coração dos ratos 6 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg). Valores expressos em média \pm SEM, n = 7-8. *p < 0,05 *versus* respectivo grupo controle, #p < 0,05 *versus* grupo LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

4.7 A Ang-(1-7) central atenuou a hiporresponsividade à NE, dependente do PVAT, induzida pelo LPS

Após a obtenção dos dados de PAM, verificamos um possível efeito vascular resultante da administração central da Ang-(1-7). A partir desse dado, avaliamos a reatividade vascular da artéria aorta torácica em resposta à NE na presença ou ausência de L-NAME e AVP. Foram avaliados a eficácia - apresentada pelo Emax (Efeito desencadeado pela concentração supra-máxima do agonista) - e a potência através do pD2 ou EC50 (50% do efeito máximo promovido pelo agonista) (Tabelas 1-5).

Inicialmente, notamos que, após 1 h da administração de LPS, houve uma redução na responsividade da aorta à NE, e que esse efeito era dependente da presença do PVAT (Figura 22).

A fim de avaliarmos a participação do NO, importante molécula vasodilatadora, no efeito vasodilatador induzido pelo LPS, nós adicionamos, na cuba, L-NAME. Nesse sentido, notamos que a hiporresponsividade induzida pelo LPS à NE era dependente do NO (Figura 23B). Como o NO pode modular o funcionamento de canais de potássio e afetar a função vascular, também adicionamos TEA, na cuba, e verificamos a perda do efeito vasodilatador induzido pelo tratamento com LPS (Figura 23C). Verificamos ainda o efeito da adição de

AVP, na cuba, sobre a resposta de contração da NE e notamos que a presença desse hormônio não afetou a responsividade do vaso à NE (Figura 23D). A administração de Ang-(1-7) (icv), concomitante ao LPS, atenuou a hiporresponsividade vascular e a adição, *in vitro*, do L-NAME intensificou esse efeito. A adição de TEA e AVP não promoveu quaisquer modificações nos animais tratados com Ang-(1-7) nos ratos que receberam LPS.

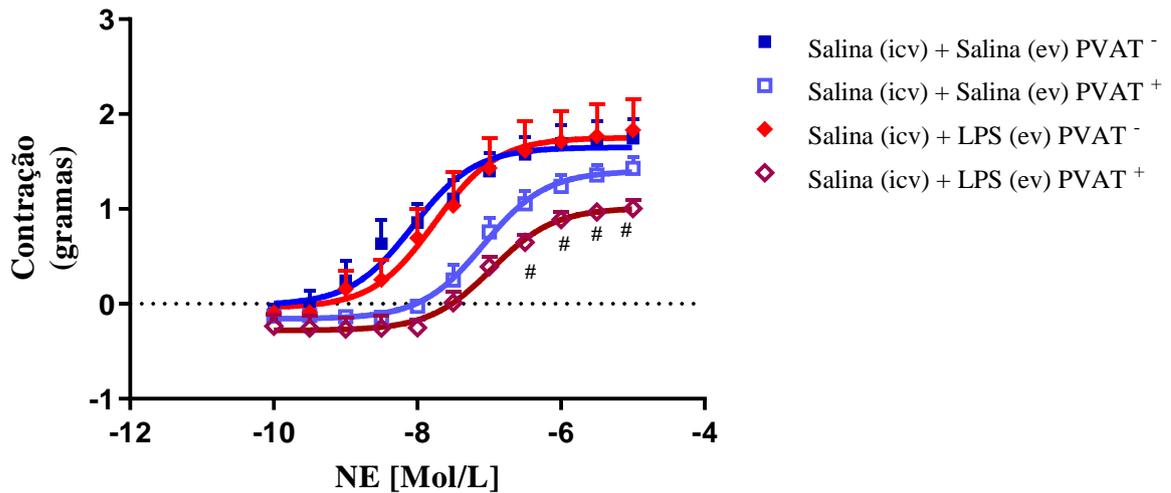


Figura 22. Efeito da administração sistêmica de LPS (1.5 mg/Kg), após 1 h, sobre a reatividade vascular da artéria aorta torácica à NE na ausência ou presença de PVAT. Valores expressos em média \pm SEM, n = 5-12. #p < 0,05 *versus* grupo LPS sem PVAT (PVAT⁻). ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

Tabela 1 - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença ou ausência de PVAT, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ou não ao LPS.

Grupos experimentais	NE (com PVAT)		NE (sem PVAT)	
	Emax	pD2	Emax	pD2
Salina (icv) + Salina (ev)	1.46 \pm 0.10	-7.17 \pm 0.16	1.75 \pm 0.20	-7.46 \pm 0.25
Salina (icv) + LPS (ev)	0.95 \pm 0.09*	-6.93 \pm 0.13	1.83 \pm 0.33	-7.97 \pm 0.38

*p < 0,05 *versus* respectivo grupo controle. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

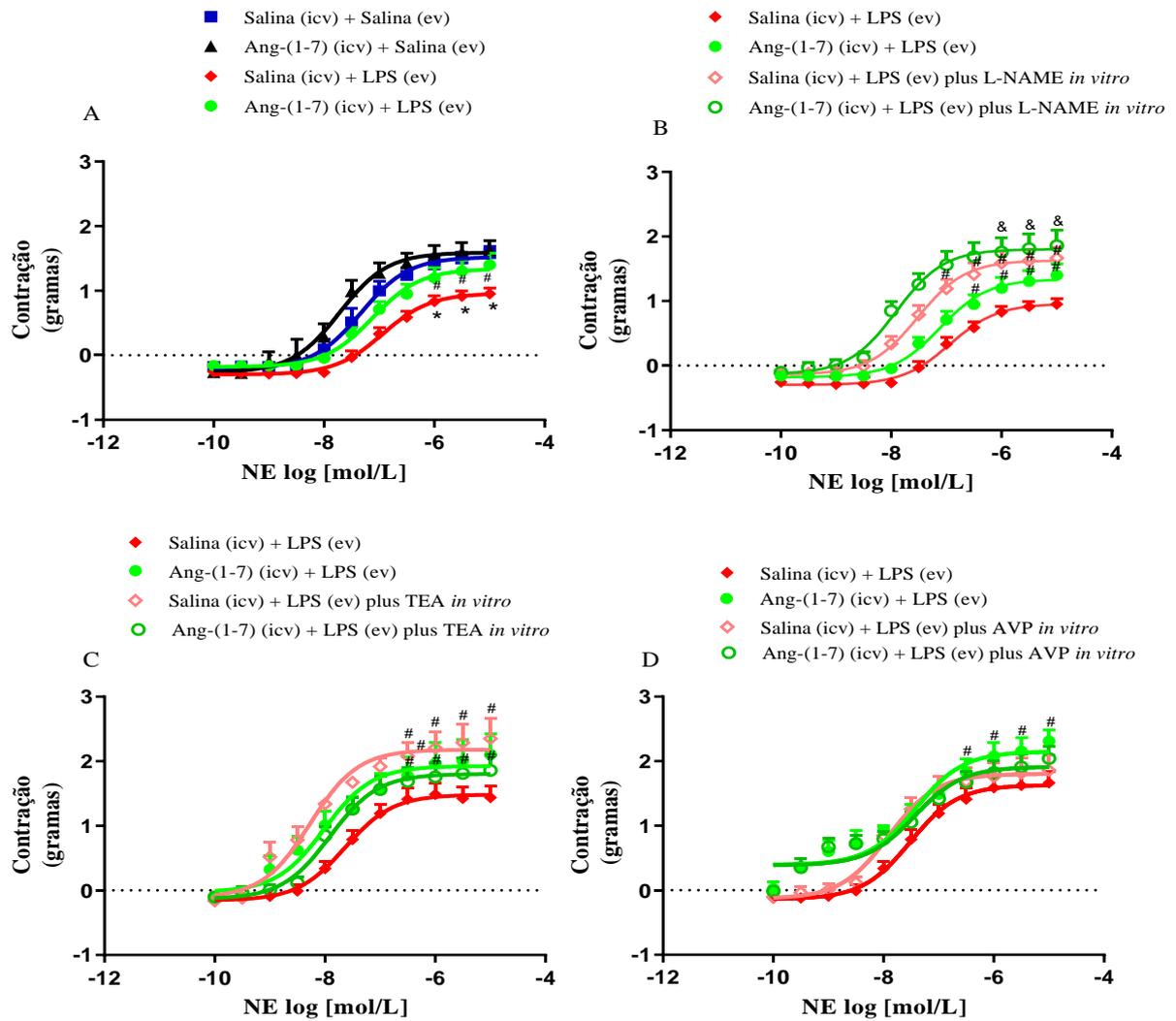


Figura 23. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μ L) sobre a reatividade vascular da artéria aorta torácica à NE na ausência (A) ou presença de L-NAME (B), TEA (C) e AVP (D) dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg). Valores expressos em média \pm SEM, n = 5-12. *p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS e &p < 0,05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 2 - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença de PVAT, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ou não ao LPS.

Grupos experimentais	NE	
	Emax	pD2
Salina (icv) + Salina (ev)	1.28 \pm 0.10	-7.17 \pm 0.16
Ang-(1-7) (icv) + Salina (ev)	1.75 \pm 0.18	-7.82 \pm 0.20
Salina (icv) + LPS (ev)	0.95 \pm 0.08*	-6.93 \pm 0.13
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev)	1.40 \pm 0.17#	-7.05 \pm 0.13

*p < 0,05 versus respectivo grupo controle, #p < 0,05 versus grupo LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 3 - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença ou ausência de L-NAME, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ou não ao LPS.

Grupos experimentais	L-NAME	
	Emax	pD2
Salina (icv) + LPS (ev)	1.86 ± 0.15	-7.91 ± 0.11
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev)	2.05 ± 0.27 [#]	-8.22 ± 0.13
Salina (icv) + LPS (ev) plus L-NAME	1.66 ± 0.17 [#]	-7.54 ± 0.09
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev) plus L-NAME	1.86 ± 0.24 ^{&}	-7.91 ± 0.04

[#]p < 0,05 versus respectivo grupo LPS sem L-NAME, [&]p < 0,05 versus grupo Ang-(1-7) + LPS sem L-NAME. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

Tabela 4 - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença ou ausência de TEA, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ou não ao LPS.

Grupos experimentais	TEA	
	Emax	pD2
Salina (icv) + LPS (ev)	1.44 ± 0.17	-7.52 ± 0.07
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev)	1.86 ± 0.24 [#]	-7.91 ± 0.10
Salina (icv) + LPS (ev) plus L-NAME	2.35 ± 0.31 [#]	-8.27 ± 0.14
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev) plus L-NAME	2.11 ± 0.32	-8.01 ± 0.15

[#]p < 0,05 versus respectivo grupo LPS sem TEA. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

Tabela 5 - Valores de Emax e pD2 obtidos das curvas concentração-efeito à NE, na presença ou ausência AVP, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos expostos ao LPS.

Grupos experimentais	AVP	
	Emax	pD2
Salina (icv) + LPS (ev)	1.66 ± 0.17	-7.52 ± 0.07
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev)	2.31 ± 0.24 [#]	-7.91 ± 0.10
Salina (icv) + LPS (ev) plus AVP	1.86 ± 0.16	-7.42 ± 0.09
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev) plus AVP	2.04 ± 0.19	-7.44 ± 0.09

[#]p < 0,05 versus respectivo grupo LPS sem AVP. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

A fim de complementarmos os dados referentes à produção de NO vascular, realizamos a dosagem de NOx na aorta torácica com PVAT. Dessa análise, notamos um aumento na concentração tecidual de NOx induzido pelo LPS e a atenuação da síntese pela

administração central de Ang-(1-7) (Figura 24). Ainda na figura 24, notamos que a simpatectomia química aboliu o efeito da administração central da Ang-(1-7). Também devemos salientar que não houve diferença estatística entre os animais do grupo controle e aqueles do grupo ODHA + ácido ascórbico 10% na quantificação tecidual de NOx (7.60 *versus* 7.21 e 5.56 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente).

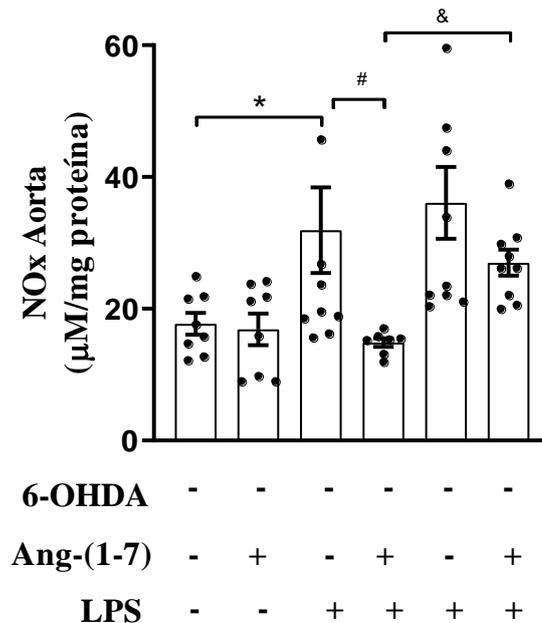


Figura 24. Efeito da administração central de Ang-(1-7) (0.3 nmol em 2 μL) sobre a concentração de NOx na artéria aorta torácica com PVAT dos ratos 1 h após a administração de LPS (1.5 mg/Kg) e a simpatectomia química por 24 h. N = 5, valores expressos em média \pm SEM. *p < 0,05 *versus* respectivo grupo controle, #p < 0,05 *versus* grupo LPS, &p < 0,05 *versus* grupo Ang-(1-7) + LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

4.8 A estimulação com NE, *in vitro*, reduziu a inflamação no PVAT induzida pelo LPS

Diante dos resultados de reatividade vascular, que sugeriram o efeito vascular indireto da administração central da Ang-(1-7) através da modulação autonômica simpática, nós avaliamos o efeito da estimulação da NE, principal neurotransmissor catecolinérgico, sobre a síntese de mediadores inflamatórios induzidos pelo LPS no PVAT. Para tal, foi realizado um protocolo, *in vitro*, na qual o PVAT era estimulado com NE e/ou LPS por 1 h e, posteriormente, avaliávamos a produção local de mediadores inflamatórios. Na figura 25, a estimulação com LPS eleva a síntese de TNF- α e IL-10 em comparação com o PVAT não estimulado. A mimetização da ativação simpática sobre o PVAT deu-se através da estimulação com NE. Na estimulação concomitante de NE e LPS, verificamos que a NE reduziu a síntese de TNF- α e intensificou a de IL-10 em comparação com o PVAT apenas

estimulado com LPS (Figura 25 A-B). Curiosamente, há apenas uma tendência, mas não se constatou diferença na produção de NOx proveniente da estimulação do PVAT pelo LPS na presença da NE (Figura 25C).

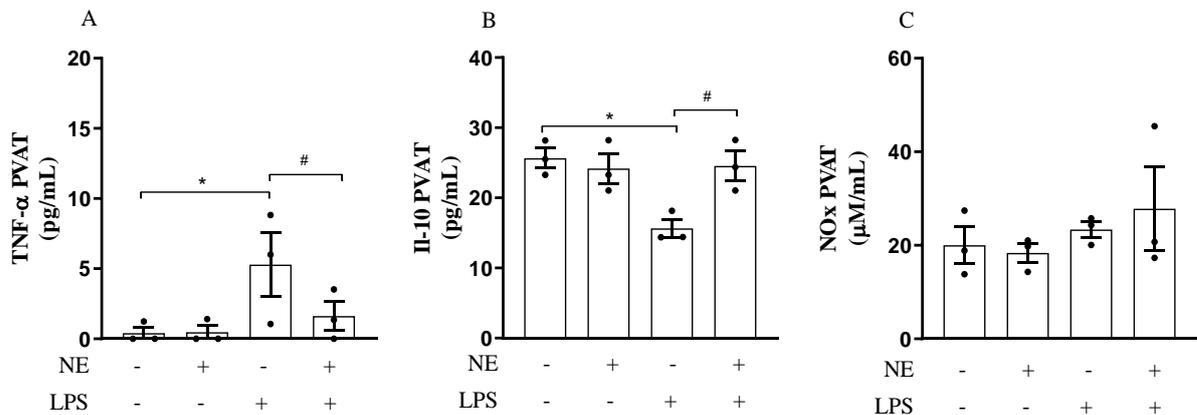


Figura 25. Efeito da estimulação da NE (0.1 μM) sobre a síntese de TNF- α (A), IL-10 (B) e NOx (C) no PVAT exposto ao LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 1 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 3 (pool de 2 animais em cada n). *p < 0,05 versus PVAT não estimulado, #p < 0,05 versus PVAT estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

4.9 O “produto do PVAT” modula a síntese de NO e a $[\text{iCa}^{+2}]$ na cultura das VSMC

A fim de verificarmos o efeito do produto do PVAT sobre a função vascular, foi desenvolvido o protocolo de estimulação, *in vitro*, da cultura de VSMC. Após a estimulação do PVAT com NE e/ou LPS, como descrito anteriormente, o “produto do PVAT” - solução de Krebs na qual o PVAT foi estimulado - foi coletado e utilizado como estímulo da cultura de VSMC para avaliarmos a produção de NO e a $[\text{iCa}^{+2}]$ após 30 min. A mensuração da produção de NO e $[\text{iCa}^{+2}]$ foi realizada através do uso das sondas fluorescentes DAF e Fluo-A3, respectivamente.

A figura 26 demonstra que, o “produto do PVAT” resultante da estimulação com LPS, intensifica a produção de NO pelas VSMCs em comparação com aquelas células apenas estimuladas com “produto do PVAT” estimulado com NE + LPS. Além disso, pudemos verificar que a produção de NO, no período, parece depender das isoformas constitutivas da NOS, pois a adição de aminoguanidina não afetou essa resposta (Figura 27).

Na figura 28 nota-se que, as células estimuladas com o “produto do PVAT” resultante do estímulo com LPS, tiveram uma redução na $[\text{iCa}^{+2}]$ e que, ao serem estimulados o “produto do PVAT” anteriormente estimulado com NE e LPS, houve o restabelecimento da

concentração desse íon, o que concordaria com os dados obtidos no protocolo de reatividade vascular. Na figura 29, podemos ainda verificar que a $[Ca^{+2}]_i$ foi alterada na presença de TEA (100 μ M), inibidor não-seletivo dos canais de potássio. É importante ressaltar que não houve diferença estatística entre os grupos controle (Solução de Krebs) e as VSMC estimulas com aminoguanidina (2993.75 *versus* 3318, respectivamente) e TEA (1417 *versus* 1846, respectivamente).

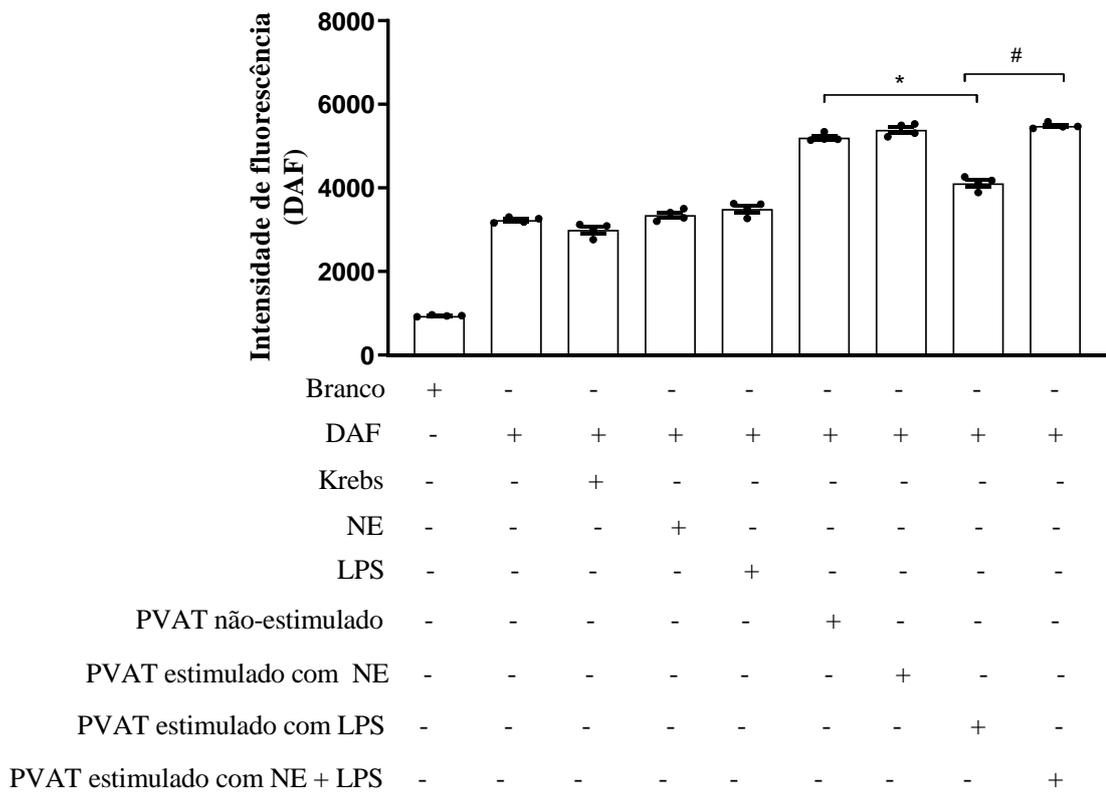


Figura 26. Efeito da estimulação do “produto do PVAT”, por 30 min, sobre a produção de NO na cultura de VSMC. Valores expressos em intensidade de fluorescência, n = 4. *p < 0,05 *versus* “produto do PVAT” não estimulado, #p < 0,05 *versus* “produto do PVAT” estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

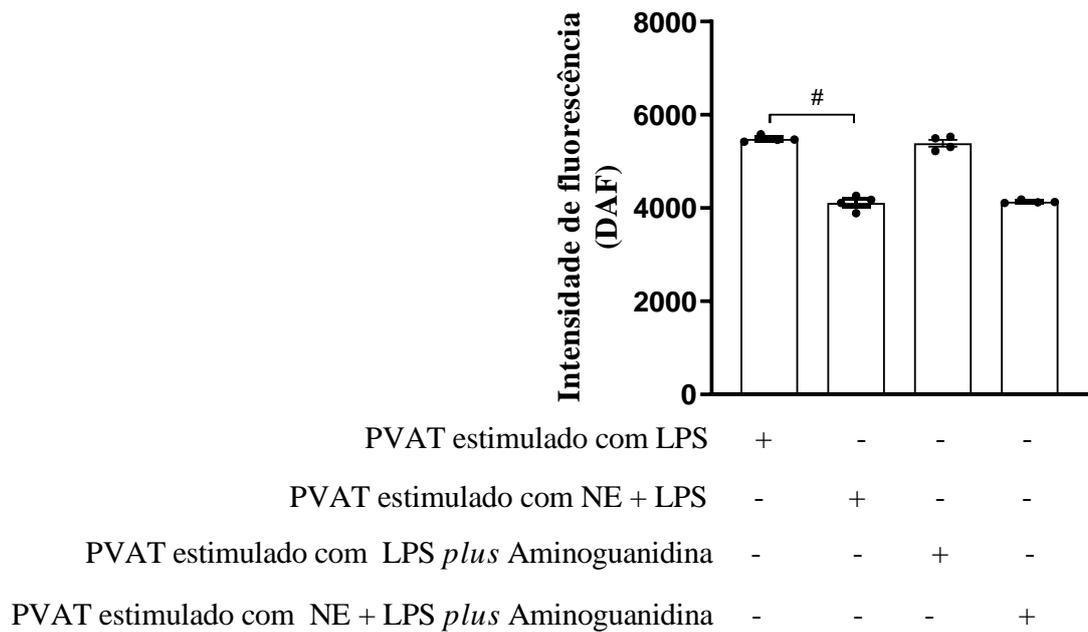


Figura 27. Efeito da estimulação do “produto do PVAT” na presença de aminoguanidina (100 μ M), por 30 min, sobre a produção de NO na cultura de VSMC. Valores expressos em intensidade de fluorescência, n = 4. # p < 0,05 versus “produto do PVAT” estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

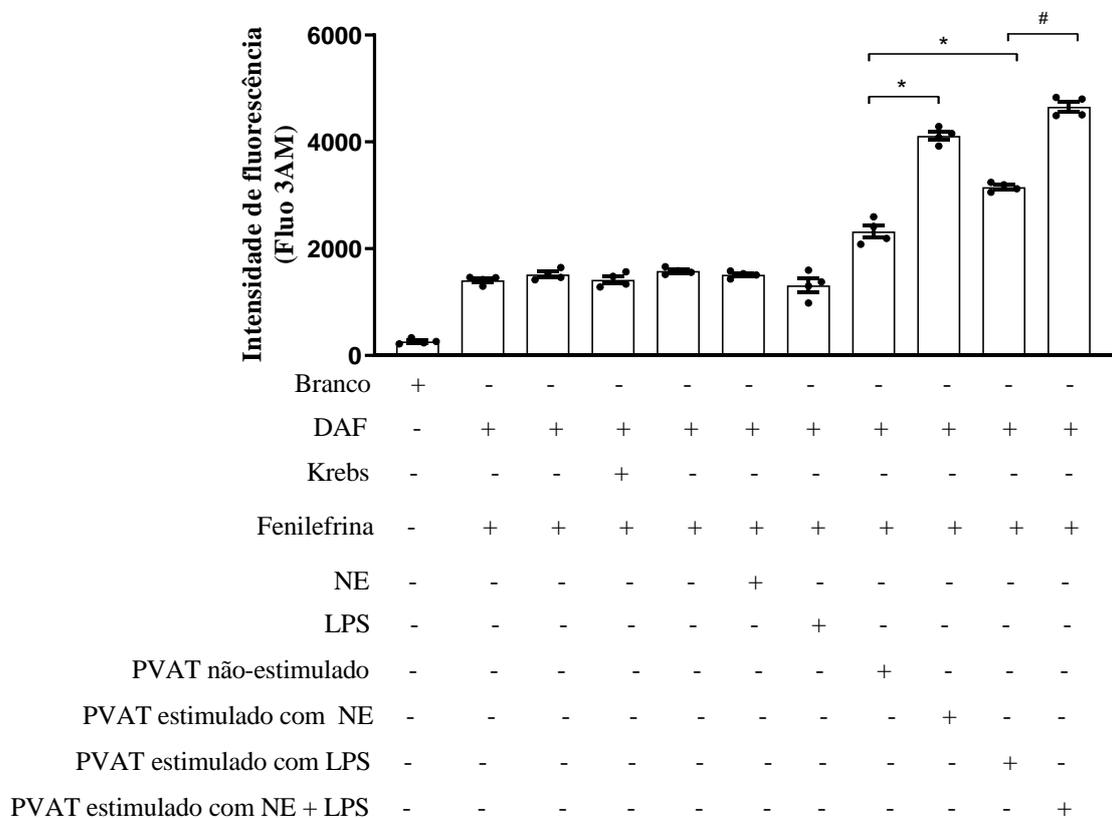


Figura 28. Efeito da estimulação do “produto do PVAT”, por 30 min, sobre a $[Ca^{2+}]_i$ na cultura de VSMC. Valores expressos em intensidade de fluorescência, n = 4. *p < 0,05 versus “produto do PVAT” não estimulado, #p < 0,05 versus “produto do PVAT” estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

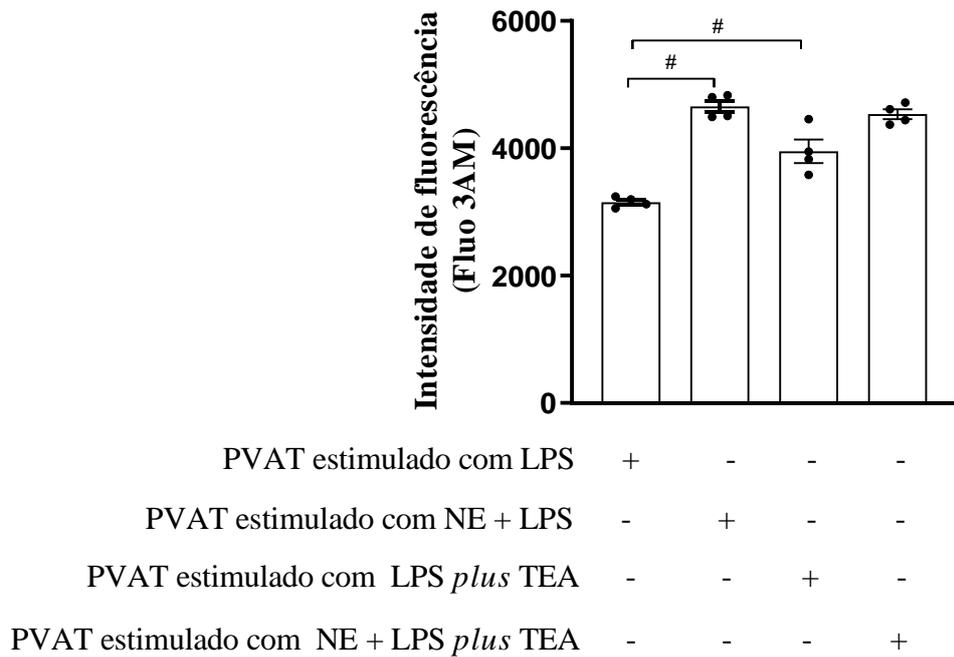


Figura 29. Efeito da estimulação do “produto do PVAT” na presença ou ausência de TEA (100 μ M) por 30 min, sobre a $[iCa^{+2}]$ na cultura de VSMC. Valores expressos em intensidade de fluorescência, $n = 4$. # $p < 0,05$ versus “produto do PVAT” estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

4.10 A estimulação com NE reduz a síntese de TNF- α e a expressão da iNOS induzidas pelo LPS na cultura de macrófagos peritoneais

Na figura 30 podemos observar a estimulação do macrófago, importante célula do sistema imune inato, pelo LPS. Ainda podemos verificar o aumento da secreção de TNF- α nos macrófagos peritoneais expostos ao LPS e o efeito anti-inflamatório induzido pela NE. Já na figura 31, verificamos a redução na expressão proteica da iNOS com a adição de NE nos macrófagos expostos ao LPS, sugerindo a participação dessa isoforma da NOS na produção de NO pelas células imunes em resposta ao estímulo do antígeno.

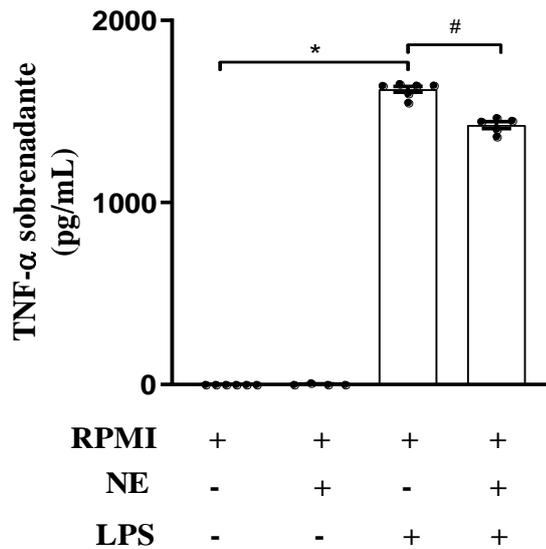


Figura 30. Efeito da estimulação da NE (0.1 μ M) sobre a síntese de TNF- α nos macrófagos peritoneais expostos ao LPS (1 μ g/mL) por 24 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 5-6. *p < 0,05 versus macrófago não estimulado, #p < 0,05 versus macrófago estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

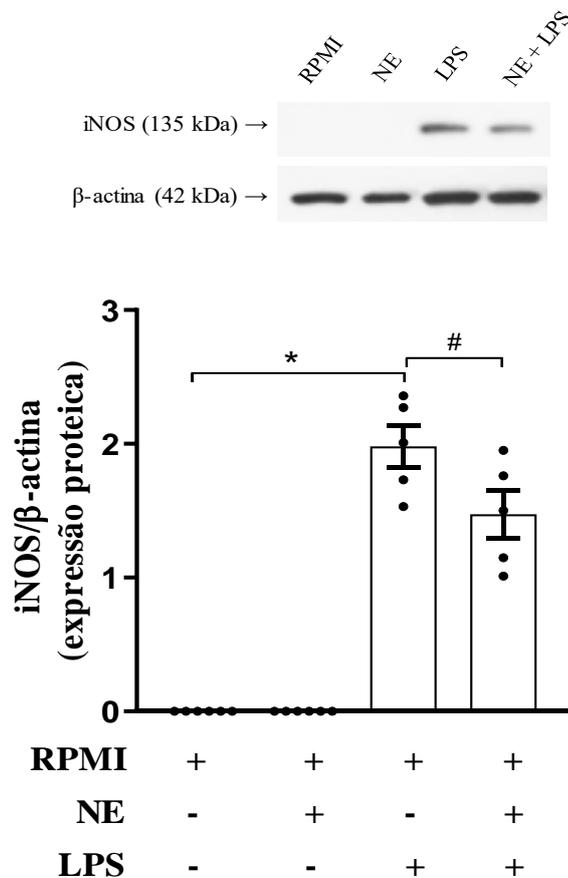


Figura 31. Efeito da estimulação da NE (0.1 μ M) sobre a expressão proteica da iNOS nos macrófagos peritoneais expostos ao LPS (1 μ g/mL) por 24 h. Valores expressos em média \pm SEM, n = 5-6. *p < 0,05 versus macrófago não estimulado, #p < 0,05 versus macrófago estimulado com LPS. ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo nós avaliamos o efeito da administração central de Ang-(1-7) no reflexo inflamatório em ratos submetidos à endotoxemia. Vale ressaltar que não há trabalhos na literatura demonstrando o efeito anti-inflamatório da Ang-(1-7), via receptor Mas, na modulação do componente neural autonômico na regulação da inflamação sistêmica, o que demonstra a relevância do estudo desenvolvido. Demonstramos que a administração central de Ang-(1-7) foi capaz de modular o arco eferente simpático do reflexo inflamatório e atenuar a síntese e liberação, periférica e tecidual, de mediadores inflamatórios, tais como as citocinas e o NO, induzidas pelo LPS. Ademais, também demonstramos a ação anti-inflamatória da Ang-(1-7) central em importantes órgãos efetores do reflexo inflamatório, como o baço, fígado e o PVAT, bem como demonstramos o restabelecimento da responsividade vascular à NE em razão da modulação autonômica simpática por esse heptapeptídeo.

A administração de LPS é um importante modelo experimental utilizado para avaliar os efeitos da inflamação sistêmica no organismo (REMICK; WARD, 2005). Em nosso estudo, a dose ev de LPS utilizada desencadeou uma resposta inflamatória caracterizada pela síntese elevada de mediadores inflamatórios periféricos e pela hipotensão. Aliado a isso, esse modelo experimental apresentou baixa taxa de mortalidade e não afetou a permeabilidade da BHE, o que o torna um modelo adequado para a avaliação dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória periférica em roedores.

Ao utilizarmos o modelo de endotoxemia, constatamos que o LPS é um potente indutor do sistema imune inato. Na cultura de macrófagos peritoneais, o LPS induziu a síntese de TNF- α , um importante marcador da resposta inflamatória aguda, bem como promoveu o aumento da expressão proteica da enzima iNOS. Além disso, a ativação do sistema imune pelo LPS pode ser constatada também pelo aumento na concentração sistêmica e tecidual (baço e fígado) dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO. Esses resultados vão de encontro com o estudo prévio realizado em nosso laboratório, que também demonstrou um rápido aumento nas concentrações séricas de TNF- α e IL-10 em resposta à administração ev, *in bolus*, de LPS (1.5 mg/Kg) (SAIA et al., 2013). Nossos achados também corroboram com outros estudos recentes, que por sua vez, demonstram que as ações sistêmicas do LPS ocorrem pela interação com o TLR4 presente na membrana de células imune (LI et al., 2019; WANG et al., 2019). Ainda nesses estudos, os autores discutem sobre as vias de sinalização, resultantes da ativação do TLR4, envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios, e

sugerem a participação das MAPKs (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) e do fator de transcrição NF- κ B. Entretanto, não foram avaliadas as vias de sinalização resultantes da ativação pelo LPS em nosso estudo.

Da ativação imunológica, há a consequente resposta inflamatória cujo papel fundamental é conter o antígeno e eliminá-lo do organismo. Entretanto, o LPS induz uma intensa liberação de mediadores pró-inflamatórios capaz de promover injúrias ao organismo se não controlada. Em nosso estudo, a intensa resposta inflamatória induzida pelo LPS pode ser atrelada à redução na taxa de sobrevivência e a hipotensão observadas nos ratos endotoxêmicos. Assim, para que haja a regulação da resposta inflamatória, inicialmente, os sinais imunes devem ser reconhecidos pelo organismo. Nesse sentido, estudos recentes demonstram o envolvimento das aferências no nervo vago no reconhecimento e transmissão do sinal imune ao SNC (HUSTON, 2012; KUNDA et al., 2014). Esses estudos verificaram a expressão e ativação do TLR4 no gânglio nodoso em resposta ao LPS, demonstrando a participação desse nervo na transmissão do sinal imune da periferia a áreas do SNC envolvidas na regulação do sistema imunológico.

O SNC é capaz de processar o sinal aferente e ativar áreas envolvidas nos mecanismos eferentes de regulação periférica da resposta inflamatória. Das áreas do SNC, o NTS é considerado uma área integradora, enquanto o RVLM e o PVN são descritos como áreas envolvidas na modulação dos mecanismos efetores (HOSOI et al., 2005). Reyes et al. (2012) verificou a ativação de c-Fos nos neurônios do NTS após a administração ip de LPS. Os mesmos autores também sugeriram a projeção de neurônios do NTS ao PVN, na qual resultaria no aumento da atividade de neurônios parvo e magnocelulares e na consequente ativação do eixo HHA e na síntese de AVP, e ao RVLM, resultando na ativação de mecanismos autonômicos eferentes em função da administração periférica de LPS. Assim, conhecendo os principais mecanismos eferentes de controle da resposta inflamatória, estudos recentes estão sendo realizados a fim de avaliar a participação de drogas com ações anti-inflamatórias já descritas na regulação do sistema imune. Nesse contexto, no presente estudo, optamos por utilizar a Ang-(1-7).

A ativação do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas é considerada uma importante estratégia anti-inflamatória em diversos modelos experimentais de inflamação (SILVEIRA et al., 2010; REGENHARDT et al., 2013; XIAO et al., 2018). Em cultura de células de macrófagos peritoneais, a Ang-(1-7) é capaz de reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela estimulação com LPS (SOUZA; COSTA-NETO, 2012). Na endotoxemia, a resposta

inflamatória e a taxa de mortalidade foram intensificadas nos camundongos deficientes do receptor Mas (SOUZA et al., 2014). Nossos resultados corroboram com estes achados, visto que a administração central de Ang-(1-7) restabeleceu a taxa de sobrevivência dos ratos endotoxêmicos, bem como atenuou a resposta inflamatória sistêmica, via receptor Mas. Como dito anteriormente, não há relatos na literatura referentes à modulação dos mecanismos eferentes do reflexo inflamatório pela Ang-(1-7). Assim, fomos os primeiros a avaliar o efeito da administração central da Ang-(1-7) sobre os principais mecanismos eferentes do reflexo inflamatório. Inicialmente, avaliamos a ação da Ang-(1-7)/receptor Mas sobre o eixo HHA e a síntese de AVP, que são denominados efetores humorais no controle do sistema imune.

O eixo HHA é um importante mecanismo imunossupressor que atua pela liberação sistêmica de corticosterona (PAVLOV et al., 2003). No mesmo sentido, a liberação de AVP é capaz de reforçar a ativação do eixo HHA, visto que é um estímulo para a liberação do CRH. No presente estudo, demonstramos o aumento na liberação plasmática de corticosterona nos ratos submetidos à endotoxemia, o que corrobora com os achados de Qadri et al. (2016). Também encontramos uma elevação na concentração plasmática de AVP nos animais que receberam LPS, o que vai de encontro com estudos anteriores realizados em nosso laboratório (CÁRNIO et al., 2005; BATALHÃO et al., 2008). Na presença da Ang-(1-7), não houve alteração na concentração plasmática de corticosterona e AVP, e o bloqueio do receptor Mas também não alterou a resposta induzida pelo LPS. Considerando que, a Ang-(1-7) seja reconhecida pelo receptor Mas e exerça seu efeito anti-inflamatório periférico observado, ao não termos alterações na concentração de corticosterona e AVP com o bloqueio desse receptor, sugerimos que esse heptapeptídeo atue modulando outro mecanismo eferente para regular o sistema imune, como por exemplo, o mecanismo autonômico simpático. Assim, o próximo passo foi avaliar a participação da Ang-(1-7) no mecanismo eferente simpático através da simpatectomia química. A simpatectomia consistiu na administração sistêmica de 6-OHDA por 24 h, neurotoxina essa capaz de depletar os estoques adrenérgicos periféricos de NE e dopamina.

Estudos recentes têm enfatizado o potencial terapêutico do componente eferente simpático na endotoxemia (ROSAS-BALLINA et al., 2015). Em relação ao mecanismo autonômico eferente, o RVLM é considerado uma área chave de onde projetam-se os neurônios C1 para a IML da coluna espinal e posteriormente, para órgãos-alvo. Estudos prévios já identificaram a presença do receptor Mas no RVLM, em especial nos astrócitos dessa região (BECKER et al., 2007; GUO et al., 2010). Entretanto, a ação da Ang-(1-7) sobre

o RVLM ainda não está totalmente elucidada, mas sugere-se que aumente o *output* simpático. Bilodeau e Leiter (2018) recentemente mostraram que a administração de Ang-(1-7) no RVLM é capaz de favorecer a síntese de glutamato pelos astrócitos, que por sua vez, aumentariam a atividade dos neurônios C1 simpáticos, resultando no aumento da PA e da atividade do nervo esplâncnico. Em nosso estudo, nós fizemos a administração icv de Ang-(1-7) e nós não realizamos a imunomarcação para c-fos e receptor Mas no RVLM, mas acreditamos que essa seja uma análise fundamental para compreender melhor o local de ação desse peptídeo no SNC no contexto da imunoregulação. Assim, podemos apenas especular sobre o local em que a Ang-(1-7) atue, para modular o componente simpático eferente do reflexo inflamatório, com base nos recentes dados publicados.

Ainda em relação ao mecanismo autonômico simpático de imunoregulação, publicações recentes têm ressaltado a importância dos nervos esplâncnico e esplênico, ambos simpáticos, na modulação da resposta inflamatória em órgãos como o baço e o fígado na endotoxemia (ROSAS-BALLINA et al., 2008; JUNG; LEVESQUE; RUITENBERG, 2017; MARTELLI et al., 2019). Nesse contexto, outros estudos verificaram o aumento da atividade dos nervos esplâncnico e esplênico e a supressão da sinalização inflamatória no baço em resposta ao LPS (MACNEIL et al., 1996; GAUTRON et al., 2013). Em nosso estudo, demonstramos o aumento da síntese de TNF- α e NO, bem como a redução de IL-10 no baço e fígado dos ratos endotoxêmicos. Com a administração central de Ang-(1-7) houve a atenuação da produção dos mediadores pró e aumento dos anti-inflamatórios nos ratos que receberam LPS. Entretanto, quando antecedida pela simpatectomia química, a administração central de Ang-(1-7) teve seu efeito anti-inflamatório tecidual abolido, o que poderia sugerir a participação dos nervos simpáticos, tais como o esplâncnico e esplênico, na resposta imunoregulatória desse peptídeo. Considerando ainda que, o baço e o fígado são importantes fontes de produção das citocinas periféricas, ao induzir o efeito anti-inflamatório nesses tecidos, conseqüentemente, observamos o mesmo perfil de resposta induzida pela Ang-(1-7) sistemicamente.

Além do fígado e baço, trabalhos recentes vêm apontando a modulação do sistema autonômico simpático sobre o PVAT. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que o PVAT possui inervação autonômica simpática (EGAWA; YOSHIMATSU; BRAY, 1989). McAllen et al. (2010) inicialmente demonstrou que a ativação simpática poderia modular o tecido adiposo marrom na resposta de febre, mecanismo este que auxiliaria o organismo no combate a patógenos.

A ativação simpática, que antes era apenas relacionada à termogênese, nos dias atuais também associado ao controle das células imunes que constituem o PVAT, bem como à modulação da função vascular (SAXTON et al., 2018). Entretanto, o papel exato da inervação simpática sobre o PVAT ainda não está totalmente elucidado e parece variar de acordo com o leito vascular e o modelo experimental utilizados nos estudos. Na endotoxemia, Creely et al. (2007) verificaram que a administração sistêmica de LPS, *per se*, foi capaz de ativar as células imunes do PVAT e induzir a síntese de mediadores inflamatórios, tais como o TNF- α . No presente estudo, demonstramos que o LPS foi capaz de aumentar a síntese de TNF- α e induzir a expressão proteica de iNOS na cultura de macrófagos peritoneais. Associado a isso, também demonstramos que o estímulo de NE foi capaz de atenuar a síntese desse mediador pró-inflamatório e expressão proteica dessa enzima induzidas pelo LPS. Além disso, mostramos que houve redução na síntese de TNF- α e aumento na secreção de IL-10 no PVAT estimulado com NE antes da estimulação direta do LPS, sugerindo que talvez, da mesma maneira, a estimulação simpática poderia atuar nos macrófagos presentes no PVAT e modular a inflamação. Nossos achados vão ao encontro com os apresentados por Tang et al. (2015), que verificaram ainda que a resposta anti-inflamatória do sistema simpático sobre o PVAT é dependente da interação da NE no receptor β_2 -adrenérgico localizado na membrana dos macrófagos locais.

Em condições patológicas, há evidências que o PVAT se torna disfuncional e encontra-se em estado pró-inflamatório, direcionando suas atividades para a secreção de mediadores inflamatórios (MIKOLAJCZYK et al., 2016). A secreção de mediadores pró-inflamatórios pelo PVAT pode afetar, diretamente, a função vascular, e essa ação pode-se dar nas células endoteliais e nas VSMC (GUZIK et al., 2017). Dos mediadores pró-inflamatórios secretados, destaca-se o TNF- α , citocina com potente ação vascular (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010). No estudo clássico de Thiemermann et al. (1993), mostrou-se que o TNF- α é capaz de induzir hiporesponsividade vascular à NE ao induzir a síntese de NO na aorta de ratos endotoxêmicos. O estudo de Hai-Mei et al. (2013) complementou esses achados demonstrando que a hiporeatividade vascular da aorta, na endotoxemia, é resultado da secreção de NO pelo PVAT. Nossos achados corroboram com esses estudos, pois verificamos, *in vitro*, o aumento da produção de TNF- α e NO pelo PVAT em resposta ao LPS, bem como observamos o aumento na concentração de NO na aorta torácica dos animais que receberam LPS. Além disso, constatamos que a hiporesponsividade da aorta à NE era dependente da produção de NO pelo PVAT nos ratos endotoxêmicos. Ainda em nossos achados, verificamos que a produção de NO nas VSMC não é dependente de iNOS, embora

acreditamos que outro tipo de inibidor seletivo na iNOS deve ser utilizado ao invés da aminoguanidina e aliado a isso, o tempo de estimulação seja insuficiente para a expressão dessa enzima induzível nos ratos endotoxêmicos. O estudo prévio realizado em nosso laboratório demonstrou a expressão proteica da iNOS, na aorta, apenas 6 h após a administração sistêmica de LPS (SAIA et al., 2013).

Apesar das similaridades com estudos prévios, a novidade de nosso estudo está no fato de que a administração central de Ang-(1-7) foi capaz de atenuar a síntese de NO na aorta torácica via ativação do componente eferente simpático, pois perdeu-se esse efeito com a simpatectomia química. Considerando ainda essa ideia, de forma indireta, vimos que, *in vitro*, a NE foi capaz de atenuar síntese de TNF- α e NO, e elevar a secreção de IL-10 no PVAT em resposta ao LPS. Além disso, é importante salientar que o efeito vascular indireto da Ang-(1-7) não foi dado pela concentração sérica elevada de AVP, pois a presença desse hormônio não afetou a responsividade da aorta à NE. Assim, atribuímos esse efeito da Ang-(1-7) central à ativação do sistema simpático eferente, a qual atenuou a resposta inflamatória no PVAT e restabeleceu a responsividade da aorta à NE nos animais endotoxêmicos.

Ainda em relação ao efeito vascular do NO na inflamação, tem-se demonstrado que o NO é capaz de modular a abertura dos canais de potássio nas VSMC. No músculo liso vascular, o estudo de O'Brien et al. (2009) demonstrou que, a ativação aumentada da via NO/guanilato ciclase era responsável pela abertura de canais de potássio e pela hiperpolarização, na qual reduzia a probabilidade de abertura dos canais de Ca^{+2} sensíveis à voltagem, redução da $[iCa^{+2}]$ e no consequente vasorelaxamento induzido pelo LPS. A redução na $[iCa^{+2}]$ e o vasorelaxamento da aorta durante a inflamação também foram observados por Tanaka; Koike e Toro (2004). De forma semelhante, verificamos em nosso estudo que a redução na resposta contrátil à NE era dependente da abertura dos canais de potássio na endotoxemia, visto que houve atenuação dessa resposta com o uso do TEA, um inibidor não-seletivo dos canais de potássio. Nas análises, *in vitro*, também observamos a redução na $[iCa^{+2}]$ na cultura de VSMC em resposta ao “produto do PVAT” estimulado com LPS. Nesse sentido, acreditamos que o TNF- α produzido pela PVAT seja capaz de induzir a síntese de NO na aorta, que por sua vez favoreceria a abertura dos canais de potássio e explicaria a redução na $[iCa^{+2}]$ e hiporesponsividade vascular observada em nosso estudo. Ainda vimos que, ao utilizarmos o TEA, houve um aumento na $[iCa^{+2}]$ sugerindo que a abertura dos canais de potássio possa estar promovendo a redução na $[iCa^{+2}]$ em nosso modelo experimental.

A alteração na função vascular constatada na inflamação sistêmica pode ainda resultar em alterações na PAM e FC. Diversos estudos suportam o conceito que a intensa síntese de mediadores pró-inflamatórios são os responsáveis pelos efeitos deletérios na inflamação sistêmica, incluindo a hipotensão (TUNCTAN et al., 2010; SALLAM et al., 2016, 2017). Dentre os mediadores pró-inflamatórios, o TNF- α causa redução da contratilidade cardíaca, diminuição da fração de ejeção, diminuição da resistência vascular periférica e hipotensão (OKUSAWA et al., 1988; SCHULZ et al., 1995; KUMAR et al., 1996; CAIN et al., 1999; KUMAR et al., 2007). Na endotoxemia, estudos prévios realizados em nosso laboratório, mostraram que hipotensão induzida pelo LPS é mediada pela intensa síntese de mediadores inflamatórios (STABILE et al., 2007; BATALHÃO et al., 2008; SAIA et al., 2013). Em nossos resultados, também constatamos hipotensão, seguida de uma resposta taquicárdica nos animais tratados com LPS. Na presença da Ang-(1-7), houve o restabelecimento da PAM, sem a alteração do aumento da FC, nos ratos que receberam LPS, o que poderíamos sugerir ser resultado da ação anti-inflamatória sobre o PVAT e do consequente aumento na resistência vascular periférica. Além disso, verificamos a redução na concentração cardíaca de TNF- α 6 h após o tratamento com Ang-(1-7) e LPS, o que pode ter promovido um aumento na contratilidade cardíaca e na fração de ejeção, resultando no aumento do débito cardíaco e na PAM, sem afetar a FC que permaneceu elevada em comparação aos animais controle. Entretanto, análises para constatar o aumento na contratilidade cardíaca e na fração de ejeção devem ser realizadas para inferirmos essa resposta da Ang-(1-7) no modelo de endotoxemia utilizado em nosso estudo.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados sugerem que a administração central de Ang-(1-7) é capaz de ativar o componente autonômico simpático eferente do reflexo inflamatório para exercer sua ação anti-inflamatória sobre baço, fígado e PVAT, favorecendo o restabelecimento da responsividade vascular e hipotensão, que podem ser responsáveis pela melhora na sobrevivência dos ratos tratados com LPS.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S.H.I.V. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- ABE, C.; INOUE, T. Role of C1 neurons in anti-inflammatory reflex: Mediation between afferents and efferents. **Neuroscience Research.**, p. 1-7, 2018.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- ANDERSSON, U.; TRACEY, K.J. Reflex principles of immunological homeostasis. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 313-35, 2012.
- BADER, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. **Ann Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 50, p. 439-465, 2010.
- BANKS, W.A. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. **Brain Behav Immun**, v. 44, n. 6, p. 1-8, 2015.
- BATALHÃO, M.E.; MORETO, V.; STABILE, A.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CARNIO, E.C. Role of dexamethasone on vasopressin release during endotoxemic shock. **Regul Pept.**, v. 147, n. 1-3, p. 67-71, 2008.
- BECKER, L. K., et al. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 3, p. H1416-24, 2007.
- BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C.A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, n. 4764, p. 652-654, 1986.
- BECKER, L.K., ETELVINO, G.M., WALTHER, T., SANTOS, R.A., CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J., Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related áreas of the rat brain. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 293, p. H1416–1424, 2007.
- BILODEAU, M.S.; LEITER, J.C. Angiotensin 1-7 in the rostro-ventrolateral medulla increases blood pressure and splanchnic sympathetic nerve activity in anesthetized rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 247, 2018.
- BLATTEIS, C.M.; HALES, J.R.; MCKINLEY, M.J., FAWCETT, A.A. Role of the anteroventral third ventricle region in fever in sheep. **Can. J. Physiol. Pharmacol**, v. 65, p. 1255-1260, 1987.
- BOROVIKOVA, L.V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458-462, 2000.

CAI, Y.; HAY, M.; BISHOP, V.S. Synaptic connections and interactions between area postrema and nucleus tractus solitarius. **Brain Res.**, v. 724, p. 121–124, 1996.

CAIN, B.S.; MELDRUM, D.R.; DINARELLO, C.A.; MENG, X.; JOO, K.S.; BANERJEE, A.; HARKEN, A.H.. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. **Crit Care Med.**, v. 27, n. 7, p. 1309-18. 1999.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; DIZ, D.I.; SANTOS, R.A.S.; KHOSLA, M.C.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. **Am J Physiol.**, v. 257, p. H324-H329, 1989.

CÁRNIO, E.C.; STABILE, A.M.; BATALHÃO, M.E.; SILVA, J.S.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L.G.S.; MAGDER, S. Vasopressin release during endotoxaemic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Eur J Physiol.**, v. 450, p. 390–394, 2005.

CHAPPELL, M.C.; BROSNIHAN, K.B.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. **J Biol Chem.**, v. 264, p. 16518-16523, 1989.

CHAVAN, S.S.; PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 927-942, 2017.

CHEN, S.J.; LI, S.Y.; SHIH, C.C.; LIAO, M.H.; WU, C.C. NO contributes to abnormal vascular calcium regulation and reactivity induced by peritonitis-associated septic shock in rats. **Shock**, v. 33, n. 5, p. 473-478, 2010.

CHI, J.; MENG, L.; PAN, S.; LIN, H.; ZHAI, X.; LIU, L.; ZHOU, C.; JIANG, C.; GUO, H. Primary Culture of Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells: A New Method. **Med Sci Monit.**, v. 23, p. 4014-4020, 2017.

COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **Journal of Immunology**, v. 121, n. 3, p. 813-816, 1978.

CREELY, S.J.; MCTERNAN, P.G.; KUSMINSKI, C.M.; FISHER, F.M.; DA SILVA, N.F.; KHANOLKAR, M.; EVANS, M.; HARTE, A.L.; KUMAR, S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 292, n. 3, p. E740-7, 2007.

DICULESCU, I.; STOICA, M. Fluorescence histochemical investigation on the adrenergic innervation of the white adipose tissue in the rat. **J Neurovisc Relat.**, v. 32, n. 1, p. 25-36, 1970.

DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P.S.T.; STAR, R.A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, 2009.

EGAWA, M.; YOSHIMATSU, H.; BRAY, G.A. Effects of 2-deoxy-D-glucose on sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue. **Am J Phys.**, v. 257, p. R1377–85, 1989.

EHRENTRAUT, S.; FREDE, H. STAPEL, S.; MENGDEN, T.; GROHÉ, C.; FANDREY, J.; MEYER, R.; BAUMGARTEN, G. Antagonism of Lipopolysaccharide-Induced Blood Pressure Attenuation and Vascular Contractility. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 2170-2176, 2007.

ELMQUIST, J.K.; ACKERMANN, M.R.; REGISTER, K.B.; RIMLER, R.B.; ROSS, L.R.; JACOBSON, C.D. Induction of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following *Pasteurella multocida* endotoxin administration. **Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 3054-3057, 1993.

EL-SHOURA, E.A.M.; MESSIHA, B.A.S.; SHARKAWI, S.M.Z.; HEMEIDA, R.A.M. Perindopril ameliorates lipopolysaccharide-induced brain injury through modulation of angiotensin-II/angiotensin-1-7 and related signaling pathways. **Eur J Pharmacol.**, v. 5, n. 834, p. 305-317, 2018.

FERNANDEZ-ALFONSO, M.S.; GIL-ORTEGA, M.; GARCÍA-PRIETO, C.F.; ARANGUEZ, I.; RUIZ-GAYO, M.; SOMOZA, B. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. **Int J Endocrin.**, p. 1-8, 2013.

FERRARIO, C.M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. **Hypertension**, v. 47, p. 515-521, 2006.

FONTES, M.A.P.; MARTINS PINGE, M.C.; NAVES, V.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; LOPES, O.U.; KHOSLA, M.C.; SANTOS, R.A.S. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. **Brain Research.**, v. 750, p. 305-310, 1997.

FRANK, M. G. et al. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. **Brain Behavior and Immunity**, v. 24, n. 1, p. 19-30, 2010.

GAO, Y.J.; HOLLOWAY, A.C.; ZENG, Z. et al. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. **Obesity Research.**, v. 13, n. 4, p. 687-92, 2005.

GAO, Y.J. Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. **Curr Pharm Des.**, v. 13, p. 2185-92, 2007.

GAUTRON, L.; RUTKOWSKI, J.M.; BURTON, M.D.; WEI, W.; WAN, Y.; ELMQUIST, J.K. Neuronal and nonneuronal cholinergic structures in the mouse gastrointestinal tract and spleen. **J Comp Neurol.**, v. 521, n. 16, p. 3741-67, 2013.

GIRONACCI, M.M.; LONGO CARBAJOSA, N.A.; GOLDSTEIN, J.; CERRATO, B.D. Neuromodulatory role of angiotensin-(1-7) in the central nervous system. **Clin Sci (Lond).**, v. 125, n. 2, p. 57-65, 2013.

GUO, F., LIU, B., TANG, F., LANE, S., SOUSLAVA, E.A., CHUDAKOV, D.M., PATON, J.F.R., KASPAROV, S. Astroglia are a possible cellular substrate of angiotensin(1-7) effects in the rostral ventrolateral medulla. **Cardiovasc. Res.**, v. 87, n. 3, p. 578-584, 2010.

GUZIK, T.J.; SKIBA, D.S.; TOUYZ, R.M.; HARRISON, D.G. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovasc Res.**, v. 113, n. 9, p. 1009-1023, 2017.

HAI-MEI, L.; SONG-YIN, H.; RUN-MEI, L.; XIAO-HUANG, X.; LE-QUAN, Z.; XIAO-PING, L.; JIN-WEN, X. Andrographolide protects against lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity by suppressing the expression of inducible nitric oxide in periaortic adipose. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 62, n. 2, p. 154-9, 2013.

HAJIASGHARZADEH, K.; BARADARAN, B. Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway and the Liver. **Adv Pharm Bull.**, v. 7, n. 4, p. 507-513, 2017.

HALLEMEESCH, M.M.; JANSSEN, B.J.; DE JONGE, W.J.; SOETERS, P.B.; LAMERS, W.H.; DEUTZ, N.E. NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPSchallenged mice. **Am J Physiol.**, v. 285, n. 4, p. E871-E875, 2003.

HICKEY, M.J.; ISSEKUTZ, A.C.; REINHARDT, P.H.; FEDORAK, R.N.; KUBES, P. Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. **Circ Res.**, v. 83, n. 11, p. 1124-1131, 1998.

HOSOI, T.; OKUMA, Y.; MATSUDA, T.; NOMURA, Y. Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: possible role of nodose ganglion. **Auton Neurosci.**, v. 120, n. 1-2, p. 104-107, 2005.

HUSTON JM. The vagus nerve and the inflammatory reflex: wandering on a new treatment paradigm for systemic inflammation and sepsis. **Surg Infect (Larchmt).**, v. 13, n. 4, p. 187-193, 2012.

JI, H.; RABBI, M.F.; LABIS, B.; PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J.; GHIA, J.E. Central cholinergic activation of a vagus nerve-to-spleen circuit alleviates experimental colitis. **Mucosal Immunol.**, n. 7, p. 335-347, 2014.

JIANG, M.; HUANG, W.; WANG, Z.; REN, F.; LUO, L.; ZHOU, J.; YAN, R.; XIA, N.; TANG L. Anti-inflammatory effects of Ang-(1-7) via TLR4-mediated inhibition of the JNK/FoxO1 pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. **Dev Comp Immunol.**, v. 92, p. 291-298, 2019.

JUNG, W.C.; LEVESQUE, J.P.; RUITENBERG, M.J. It takes nerve to fight back: The significance of neural innervation of the bone marrow and spleen for immune function. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 61, p. 60-70, 2017.

KAKIZAKI, Y.; WATANOBE, H.; KOHSAKA, A.; SUDA, T. Temporal profiles of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in the plasma and hypothalamic paraventricular nucleus after intravenous or intraperitoneal administration of lipopolysaccharide in the rat: estimation by push-pull perfusion. **Endocr J.**, v. 46, n. 4, p. 487-796, 1999.

KAWANO, H.; MASUKO, S. Region-specific projections from the subfornical organ to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 169, p. 1227-1234, 2010.

KRITSELIS, I.; TZANETAKOU, V.; ADAMIS, G.; et al. The level of endotoxemia in sepsis varies in relation to the underlying infection: Impact on final outcome. **Immunol Lett.**, v. 152, n. 2, p. 167-172, 2013.

KROB, H.A., et al. Angiotensin-(1-7) immunoreactivity in the hypothalamus of the (mRen-2d)27 transgenic rat. **Brain Res**, v. 798, n. 1-2, p. 36-45, 1998.

KUMAR, A.; THOTA, V.; DEE, L.; OLSON, J.; URETZ, E.; PARRILLO, J.E. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. **J Exp Med**, v. 183, n. 3, p. 949-58. 1996.

KUMAR, A.; PALADUGU, B.; MENSING, J.; PARRILLO, J.E.. Nitric oxide dependent and -independent mechanisms are involved in TNF-alpha -induced depression of cardiac myocyte contractility. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 5, p. R1900-6. 2007.

KUNDA, P.E.; CAVICCHIA, J.C.; ACOSTA, C.G. Lipopolysaccharides and trophic factors regulate the LPS receptor complex in nodose and trigeminal neurons. **Neuroscience**, v. 280, p. 60-72, 2014.

LEE, M.H.H.; CHEN, S.J.; TSAO, C.M.; WU, C.C. Perivascular Adipose Tissue Inhibits Endothelial Function of Rat Aortas via Caveolin-1. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99947, 2014.

LI, Y.; CAO, Y.; ZENG, Z.; LIANG, M.; XUE, Y.; XI, C.; ZHOU, M.; JIANG, W. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK/NF- κ B pathways. **Sci Rep.**, v. 3, n. 5, p. 8209, 2015.

LI, P.; WU, Y.H.; ZHU, Y.T.; LI, M.X.; PEI, H.H. Requirement of Rab21 in LPS-induced TLR4 signaling and pro-inflammatory responses in macrophages and monocytes. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 508, n. 1, p. 169-176, 2019.

LOLAIT, S.J.; STEWART, L.Q.; JESSOP, D.S.; YOUNG, W.S. 3rd; O'CARROLL, A.M. The hypothalamic-pituitary- adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors. **Endocrinology**, n. 148, p. 849-856, 2007.

MACHADO, P.R.L., ARAÚJO, M.I.A.S., CARVALHO, L., CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 79 (6), p. 647-664. 2004.

MAHON, J.M.; ALLEN, M.; HERBERT, J.; FITZSIMONS, J.T. The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with *c-fos* expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin ii, angiotensin-(1-7) or carbachol. **Neuroscience**, v. 69, p. 199-208, 1995.

MARTELLI, D.; YAO, S.T.; MANCERA, J.; MCKINLEY, M.J.; MCALLEN, R.M. Reflex control of inflammation by the splanchnic anti-inflammatory pathway is sustained and independent of anesthesia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 307, n. 9, p. 1085-1091, 2014.

MARTELLI, D.; YAO, S.T.; MCKINLEY, M.J.; MCALLEN, R.M. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. **The Journal of physiology**, v. 592, p. 1677-1686, 2014.

MARTELLI, D.; FARMER, D.G.S.; MCKINLEY, M.J.; YAO, S.T.; MCALLEN, R.M. Anti-inflammatory reflex action of splanchnic sympathetic nerves is distributed across abdominal organs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 316, n. 3, p. R235-R242, 2019.

MCALLEN, R.M.; TANAKA, M.; OOTSUKA, Y.; MCKINLEY, M.J. Multiple thermoregulatory effectors with independent central controls. **European Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 1, p. 27-33, 2010.

MCCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. **J Exp Biol.**, v. 216, p. 84-98, 2013.

MACNEIL, B.J.; JANSEN, A.H.; GREENBERG, A.H.; NANCE, D.M. Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. **Am J Physiol.**, v. 270, p. R264-70, 1996.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MELTZER, J.C.; MACNEIL, B.J.; SANDERS, V.; PYLYPAS, S.; JANSEN, A.H.; GREENBERG, A.H.; NANCE, D.M. Contribution of the adrenal glands and splenic nerve to LPS-induced splenic cytokine production in the rat. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17, p. 482-497, 2003.

METZ, C.N.; PAVLOV, V.A. Vagus nerve cholinergic circuitry to the liver and the gastrointestinal tract in the neuroimmune communicatome. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 315, n. 5, p. G651-G658, 2018.

MIKOLAJCZYK, T.P.; NOSALSKI, R.; SZCZEPANIAK, P.; BUDZYN, K.; OSMENDA, G.; SKIBA, D.; SAGAN, A.; WU, J.; VINH, A.; MARVAR, P.J.; GUZIK, B.; PODOLEC, J.; DRUMMOND, G.; LOB, H.E.; HARRISON, D.G.; GUZIK, T.J. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. **FASEB J.**, v. 30, p. 1987-1999., 2016.

MINSON, J.; CHALMERS, J.; KAPOOR, V.; CAIN, M.; CAON, A. Relative importance of sympathetic nerves and of circulating adrenaline and vasopressina in mediating hypertension after lesions of the caudal ventrolateral medulla in the rat. **J Hypertens.**, v. 4, p. 273-281, 1986.

O'BRIEN, A.; STIDWILL, R.P.; CLAPP, L.H.; SINGER, M. Variable effects of inhibiting iNOS and closing the vascular ATP-sensitive potassium channel (via its pore-forming and sulfonylurea receptor subunits) in endotoxic shock. **Shock**, v. 31, n. 5, p. 535-41, 2009.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L.L. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. **Crit Care Med**, v. 30, p. S58-S63, 2002.

OKUSAWA, S.; GELFAND, J.A.; IKEJIMA, T.; CONNOLLY, R.J.; DINARELLO, C.A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. **J Clin Invest**, v. 81, n. 4, p. 1162-72, 1988.

OLIVEIRA, R.C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SANTOS, R.A.S. The pressor effect of angiotensin-(1-7) in the rat rostral ventrolateral medulla involves multiple peripheral mechanisms. **Clinics**, v. 68, p. 245-252, 2013.

OLOFSSON, P.S.; KATZ, D.A.; ROSAS-BALLINA, M.; LEVINE, Y.A.; OCHANI, M.; VALDE´ S-FERRER, S.I.; PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J.; CHAVAN, S.S. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) expression in bone marrow-derived non-T cells is required for the inflammatory reflex. **Mol. Med.**, v. 18, p. 539–543, 2012.

OPAL, S. M.; HUBER, C. E. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock. **Critical Care**, v. 6, n. 2, p. 125-136, 2002.

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews.**, v. 11, p. 85-97, 2011.

PARAMESWARAN N, PATIAL S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, v. 20, p. 87–103, 2010.

PAVLOV, V.A.; WANG, H.; CZURA, C.J.; FRIEDMAN, S.G.; TRACEY, K.J. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Mol. Med.**, v. 9, p. 125–134, 2003.

PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. **Nat Neurosci.**, v. 20, n. 2, p. 156-166, 2017.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, 6th Edition. San Diego: Academic Press, 2004.

QUAN N. In-depth conversation: spectrum and kinetics of neuroimmune afferent pathways. **Brain Behav Immun.**, v. 40, p. 1-8, 2014.

QADRI, F.; RIMMELE, F.; MALLIS, L.; HÄUSER, W.; DENDORFER, A.; JÖHREN, O.; BADER, M. Acute hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to LPS-induced endotoxemia: expression pattern of kinin type B1 and B2 receptors. **Biological Chemistry**, v. 39, n. 2, 2016.

REGENHARDT, R.W.; DESLAND, F.; MECCA, A.P.; PIOQUINTO, D.J.; AFZAL, A.; MOCCO, J.; SUMNERS, C. Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 154-163, 2013.

REMICK, D.G.; WARD, P.A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. **Shock**, v. 24, Suppl 1, p. 7-11, 2005.

REYES, E.P.; ABARZÚA, S.; MARTIN, A.; RODRÍGUEZ, J.; CORTÉS, P.P.; FERNÁNDEZ R. LPS-induced c-Fos activation in NTS neurons and plasmatic cortisol increases in septic rats are suppressed by bilateral carotid chemodenervation. **Adv Exp Med Biol.**, v. 758, p. 185-190, 2012.

ROSAS-BALLINA, M.; OCHANI, M.; PARRISH, W.R.; OCHANI, K.; HARRIS, Y.T.; HUSTON, J.M.; CHAVAN, S.; TRACEY, K.J. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia, **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 31, p. 11008-13, 2008.

ROSAS-BALLINA, M.; VALDÉS-FERRER, SI.; DANCHO, M.E.; OCHANI, M.; KATZ, D.; CHENG, K.F.; OLOFSSON, P.S.; CHAVAN, S.S.; AL-ABED, Y.; TRACEY, K.J.; PAVLOV, V.A. Xanomeline suppresses excessive pro-inflammatory cytokine responses through neural signal-mediated pathways and improves survival in lethal inflammation. **Brain Behav Immun.**, v. 44, p. 19-27, 2015.

RUSSELL, J.A.; WALLEY, K.R. Vasopressin and its immune effects in septic shock. **J Innate Immun.**, v. 2, n. 5, p. 446-60, 2010.

SAIA, R. S., BERTOZI, G.; MESTRINER, F.L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; QUEIROZ CUNHA, F.; CARNIO, E.C. Cardiovascular and inflammatory response to cholecystokinin during endotoxemic shock. **Shock**, v. 39, n. 1, p. 104-13. 2013.

SALLAM, M.Y.; EL-GOWILLY, S.M.; ABDEL-GALIL, A.G.; EL-MAS, M.M. Modulation by central MAPKs/PI3K/sGc of the TNF-alpha/iNOS-dependent hypotension and compromised cardiac autonomic control in endotoxic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 68, p. 171–181, 2016.

SALLAM, M.Y.; EL-GOWILLY, S.M.; ABDEL-GALIL, A.A.; EL-MAS, M.M. Cyclosporine counteracts endotoxemia-evoked reductions in blood pressure and cardiac autonomic dysfunction via central sGC/MAPKs signaling in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 797, p. 143–152, 2017.

SANTOS, R.A.S.; BROSNIHAN, K.B.; CHAPPELL, M.C.; PESQUERO, J.L.; CHERNICKY, C.L.; GREENE, L.J.; FERRARIO, C.M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in dog brainstem. **Hypertension**, v. 11, p. I153-I157, 1988.

SANTOS, R.A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; BARACHO, N.C.; FONTES, M.A.; SILVA, L.C.; NEVES, L.A.; OLIVEIRA, D.R.; CALIGIORNE, S.M.; RODRIGUES, A.R.; GROPEN, JUNIOR C. Characterization of a new angiotensin antagonist seletive for angiotensin-(1-7) evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. **Brain Res Bull.**, v. 35, p. 293-298, 1994.

SANTOS, R.A.; SIMOES E SILVA, A.C.; MARIE, C.; SILVA, D.M.; MACHADO, R.P.; DE BUHR, I. Angiotensin-(1-7) is na endogenous ligand for the G protein-coupled receptor MAS. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 100, p. 8258-63, 2003.

SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J.; PINHEIRO, S.V.; SAMPAIO, W.O.; TOUZY, R.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Angiotensin-(1-7) and ists receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. **Expert Opin Investig Drugs.**, v. 14, p. 1019-31, 2005.

SANTOS, R.A.; FERREIRA, A. J.SIMOES, E. S. A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. **Exp Physiol**, v. 93, n. 5, p. 519-27, 2008.

SAXTON, S.N.; RYDING, K.E.; ALDOUS, R.G.; WITHERS, S.B.; OHANIAN, J.; HEAGERTY, A.M. Role of sympathetic nerves and adipocyte catecholamine uptake in the vasorelaxant function of perivascular adipose tissue. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 38, p. 880–91, 2018.

SAXTON, S.N.; WITHERS, S.B.; HEAGERTY, A.M. Emerging Roles of Sympathetic Nerves and Inflammation in Perivascular Adipose Tissue. **Cardiovasc Drugs Ther.**, p. 1-15, 2019

SCHULZ, R.; PANAS, D.L.; CATENA, R.; MONCADA, S.; OLLEY, P.M.; LOPASCHUK, G.D. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 1, p. 27-34. 1995.

SILVA, L.C.S.; FONTES, M.A.P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; KHOSLA, M.C.; CAMPOS Jr, R.R.; GUERTZENSTEIN, P.G.; SANTOS, R.A.S. Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. **Brain Research.**, v. 613, p. 321-325, 1993.

SILVEIRA, K.D.; COELHO, F.M.; VIEIRA, A.T.; et al. Anti-Inflammatory Effects of the Activation of the Angiotensin-(1-7) Receptor, Mas, in Experimental Models of Arthritis. **J Immunol.**, v. 185, n. 9, 2010.

SOUZA, L.L.; COSTA-NETO, C.M. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. **Cellular Physiology**, v. 227, p. 2117-2122, 2012.

SOUZA, L.L.; DUCHENE, J.; TODIRAS, M.; AZEVEDO, L.C.P.; COSTA-NETO, C.M.; ALENINA, N.; SANTOS, R.A.; BADER, M. Receptor mas protects mice against hypothermia and mortality induced by endotoxemia. **SHOCK**, v. 41, p. 331-336, 2014.

STABILE, A.M.; MORETO, V.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CARNIO, E.C. Participation of the inducible nitric oxide synthase on atrial natriuretic peptide plasma concentration during endotoxemic shock. **Regulatory Peptides**, v. 140, p. 136–141, 2007.

STABILE, A.M.; MORETO, V.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CARNIO, E.C. Central but not systemic inhibition of inducible nitric oxide synthase modulates oxytocin release during endotoxemic shock. **Regulatory Peptides**, v. 31, p. 706-711, 2010.

STITT, J.T. Passage of immunomodulators across the blood-brain barrier. **Yale J. Biol. Med.**, v. 63, p. 121-131, 1990.

STOCKER, S.D.; WILSON, M.E.; MADDEN, C.J.; LONE, U.; SVED AF. Intravenous 6-hydroxydopamine attenuates vasopressin and oxytocin secretion stimulated by hemorrhage and hypotension but not hyperosmolality in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 291, n. 1, p. R59-67, 2006.

TACCONE, F.S.; SU, F.; PIERRAKOS, C.; HE, X.; JAMES, S.; DEWITTE, O.; VINCENT, J.L.; DE BACKER, D. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. **Crit Care.**, v. 14, n. 4, p. R140, 2010.

TANAKA, Y.; KOIKE, K.; TORO, L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. **J Smooth Muscle Res.**, v. 40, n. 4-5, p. 125-53, 2004.

TANG, L.; OKAMOTO, S.; SHIUCHI, T.; TODA, C1.; TAKAGI, K.; SATO, T.; SAITO, K.; YOKOTA, S.; MINOKOSHI, Y. Sympathetic Nerve Activity Maintains an Anti-Inflammatory State in Adipose Tissue in Male Mice by Inhibiting TNF- α Gene Expression in Macrophages. **Endocrinology.**, v. 156, n. 10, p. 3680-94, 2015.

THIEMERMANN, C.; WU, C.C.; SZABÓ, C.; PERRETTI, M.; VANE, J.R. Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock. **Br J Pharmacol.**, v. 110, n. 1, p. 177-82, 1993.

TSAI, H.; LIAO, M.; SHIH, C.; KA, S.; TSAO, C.; WU, C. Angiotensin-(1-7) attenuates organ injury and mortality in rats with polymicrobial sepsis. **Crit Care.**, v. 22, n. 1, p. 269, 2018.

TUNCTAN, B.; KORKMAZ, B.; CUEZ, T.; KEMAL BUHARALIOGLU, C.; SAHAN-FIRAT, S.; FALCK, J.; MALIK, K.U. Contribution of vasoactive eicosanoids and nitric oxide production to the effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, on endotoxin-induced hypotension in rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 107, p. 877-882, 2010.

VECSEI, P. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone and compounds M. JAFFE (Ed.), *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, **Acad. Press.**, p. 767-792, 1979.

WAN, W.; WETMORE, L.; SORENSEN, C.M.; GREENBERG, A.H.; NANCE, D.M. Neural e biochemical mediators of endotoxin e stress-induced c-fos expression in the rat brain. **Brain Res Bull**, v. 34, p. 7-14, 1994.

WANG, M.; KONG, X.; XIE, Y.; HE, C.; WANG, T.; ZHOU, H. Role of TLR 4 in anti β 2 glycoprotein I induced activation of peritoneal macrophages and vascular endothelial cells in mice. **Mol Med Rep.**, v. 19, n. 5, p. 4353-4363, 2019.

WATTS, S.W.; SHAW, S.; BURNETT, R.; DORRANCE, A.M. Indoleamine 2,3-dioxygenase in periaortic fat: mechanisms of inhibition of contraction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 301, p. H1236-H1247, 2011.

XIAO, H.; LIU, X.; WANG, Y.; WANG, G.; YIN, C. Angiotensin-(1-7) prevents lipopolysaccharide-induced hepatocellular inflammatory response by inhibiting the p38MAPK/AP-1 signaling pathway. **Mol Med Rep.**, v. 17, n. 4, p. 5492-5497, 2018.

XU, P.; SRIRAMULA, S.LAZARTIGUES, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 4, p. R804-17, 2011.

YU, X.J.; MIAO, Y.W.; LI, H.B.; SU, Q.; LIU, K.L.; FU, L.Y.; et al. Blockade of Endogenous Angiotensin-(1-7) in Hypothalamic Paraventricular Nucleus Attenuates High Salt-Induced Sympathoexcitation and Hypertension. **Neurosci Bull.**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 2019.

ZHANG, T. Y.; DAYNES, R. A. Glucocorticoid conditioning of myeloid progenitors enhances TLR4 signaling via negative regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2517-2526, 2007.

APÊNDICE A

APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO

Central angiotensin-(1-7) attenuates peripheral inflammatory response by the sympathetic efferent arm of anti-inflammatory reflex in endotoxemic rats.

Patrícia Passaglia ^{a,1}, Felipe de Lima Faim ^a, Marcelo Eduardo Batalhão ^b, Micheli Paulo ^c, Lusiane Maria Bendhack ^c, José Antunes-Rodrigues ^a, Alexandre Kanashiro ^{d,e}, Evelin Capellari Carnio ^{a,b,1}

^a Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of General and Specialized Nursing Ribeirão Preto College of Nursing - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Department of Physiological Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

Highlights:

- Central angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] modulation of systemic inflammation is reported.
- Ang-(1-7) icv injection attenuates pro-inflammatory mediators production in the spleen and liver in endotoxemic model (TNF- α and NO)
- Inflammation response in PVAT was modulated by Ang-(1-7) through modulation of sympathetic efferent arc of inflammatory reflex
- Vascular responsiveness of thoracic aorta and blood pressure was restored by Ang-(1-7) in rats submitted to endotoxemia.

Abstract

Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] has been pointed as important anti-inflammatory neuropeptide in a number of inflammatory models. However, a possible action of Ang-(1-7) on sympathetic efferent axis to inflammatory response control in endotoxemia has not been described in the literature. Thus, the aim this study was to determine whether the Ang-(1-7) can modulate the systemic inflammatory response in endotoxemic animals via a central mechanism, and whether this effect is mediated by a sympathetic circuit. In this way, we used male *Wistar* rats (215-220 g) submitted to endotoxemia by systemic endovenous administration of lipopolysaccharide (LPS) (1.5 mg/Kg, ev) and chemical sympathectomy induced by ev administration of 6-OHDA (100 mg/Kg). We also combined LPS treatment with intracerebroventricular (icv) injection of Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) and/or A779 (3 nmol in 2 μ L) e observed that this peptide, via Mas receptor, was able to attenuate serum and tissue (spleen and liver) of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and nitric oxide (NO) and increased interleukin-10 (IL-10) concentration LPS-induced, and this effect was abolished when chemical sympathectomy was performed. LPS-induced increases in corticosterone and AVP plasma concentration and Ang-(1-7) was not able to change this effect. When the effect of LPS treatment was analyzed, rings of thoracic aorta artery of endotoxemic rats, we observed a low resistance in response to NE and this effect was dependent on perivascular adipose tissue (PVAT) NO secretion and vascular hyperpolarization, while Ang-(1-7) central administration was able to restore the vascular responsiveness. In another *in vitro* protocol, using vascular smooth muscle cells (VSMC) culture we observed that concomitant stimulation of NE and LPS stimulation have reduced proinflammatory effect of LPS on PVAT (for 1 h) and increased intracellular Ca^{+2} level in VSMC. Taken together, these data suggest that Ang-(1-7), via Mas receptor, controls the sympathetic component of

inflammatory reflex and exerts anti-inflammatory effect on spleen, liver and PVAT resulting in vascular responsiveness and blood pressure recovery in rats treated with LPS.

Keywords: Angiotensin-(1-7), Lipopolysaccharide, sympathetic efferent arc, inflammatory reflex, neuroimmunomodulation, systemic inflammation, cytokines, nitric oxide, vascular reactivity, hypotension.

1. Introduction

Renin-angiotensin system (RAS) is involved in the control of blood pressure and electrolyte balance, mainly by the action of an octapeptide hormone known as angiotensin (Ang)-II via AT₁ receptors (Basso; Terragno, 2001; Geara et al., 2009; Zhuo et al., 2013). Among the pathophysiological role of Ang-II in the cardiovascular and renal functions, such as vasoconstriction, fluid retention and aldosterone secretion, this vasoactive peptide also exerts pro-inflammatory properties by inducing the production of adhesion molecules and cytokines (Zhao et al., 2004; Viel et al., 2010). On the other hand, angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], a breakdown product of the Ang-II, showed protective effects in the cardiovascular and renal systems via activation of a G protein-coupled receptor named Mas (Santos et al., 2003). Moreover, this heptapeptide suppresses pro-inflammatory cytokine release from monocytes and macrophages and showed anti-inflammatory effects in endotoxemia and polymicrobial sepsis (Souza and Costa-Neto, 2012; Souza et al., 2014; Tsai et al., 2018). The systemic administration of Ang-(1-7) is effective in animal models of atherosclerosis, cerebral ischemia, obesity, chronic kidney disease, arthritis and asthma (Rodrigues Prestes et al., 2017). However, its anti-inflammatory mechanisms are not fully elucidated.

Recent studies have demonstrated an elaborate neuroimmune interactions in which the central nervous system (CNS) plays a key role in the regulation of systemic inflammation by different pathways, mainly hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and sympathetic nervous system (Pavlov et al., 2018). While the first pathway is an elaborate neuroendocrine circuit responsible for the release of corticosteroids, a steroidal hormone with potent immunosuppressive properties, in response to inflammatory mediators (Besedovsky et al., 1986), the second exerts its immune-modulatory properties promoting catecholamines release and subsequent activation of beta-2 adrenoceptors (Rosas-Ballina et al., 2008; Vida et al., 2011; Abe et al., 2017; Bassi et al., 2017).

Considering that (i) Ang-(1-7) acts as a central biologically active neuropeptide controlling, for example, the baroreflex, an autonomic physiological mechanism responsible for the cardiovascular homeostasis (Campagnole-Santos et al, 1989; Barnes, Knowles, Ferrario, 1990; Gironacci et al, 2013); and (ii) the existence of neuroimmune circuits that regulates the innate immunity, the aim of the present study was to determine whether the Ang-(1-7) can modulate the systemic inflammatory response in endotoxemic animals via a central mechanism, and whether this effect is mediated by a sympathetic circuit.

2. Material and methods

2.1. Animal experiments

Experiments were performed on adult male *Wistar* rats (215–220g) obtained from the Main Animal Facility of the University of São Paulo, campus of Ribeirão Preto. The animals were housed at controlled temperature ($23.0 \pm 2^\circ\text{C}$) and exposed to a daily 12h light dark cycle and provided with food and water *ad libitum*. All experimental protocols were performed in accordance with the guidelines of the Ethics Committee on Animal

Experimentation of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (COBEA Protocol 14.872.53.4).

2.2. Drugs

Ang-(1-7) (Angiotensin Fragment 1-7 acetate salt hydrate; A9202), 6-OHDA (6-Hydroxydopamine hydrochloride; H4381), LPS (*Escherichia coli* serotype O111:B4), NE [L-(-)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt monohydrate; A9512], L-NAME (N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; N5751), tetraetilamônio (tetraethylammonium - TEA; 86616), AVP [(Arg8)-Vasopressin acetate salt; V9879], ascorbic acid (L-Ascorbic acid; A92902); 4-(6-Acetoxy-methoxy-2,7-dichloro-3-oxo-9-xanthenyl)-4'-methyl-2,2'(ethylenedioxy)dianiline-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxy-methyl) ester (Fluo-3AM; 73881), and Evans blue dye were purchased from Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO, USA), and A779 [((D-Ala⁷)-Angiotensin I/II (1-7) trifluoroacetate salt; H-2888) was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Ang-(1-7), A779, LPS, NE, L-NAME, TEA and AVP were dissolved in 0.9% sterile isotonic saline (Aldrich, Milwaukee, Wis), and 6-OHDA was dissolved in 10 % ascorbic acid solution.

2.3. Surgical procedures

2.3.1. Stereotaxic surgery

Seven days before the experiment, rats were anesthetized with ketamine and xylazine (90 mg/kg and 9 mg/kg i.p., diluted in 0.9% isotonic saline; Aldrich, Milwaukee, Wis) and fixed in a stereotaxic frame. A stainless steel guide cannula (0.4 mm) was introduced into the

right lateral ventricle (coordinates: A: -1.6 mm, L: 1 mm, D: 3.6 mm). The displacement of the meniscus in a water manometer ensured correct position of the cannula in the lateral ventricle. The cannula was attached to the bone with stainless steel screws and acrylic cement. A tight-fitting stylet was kept inside the guide cannula to prevent occlusion and infection. At the end of surgery, all animals received an injection of a polyvalent veterinary antibiotic (Pentabiótico, 0.2 mL, intramuscular; Fort Dodge, Campinas, SP, Brazil).

2.3.2. Jugular vein cannulation

For intravenous drug administration, the rats were generally anesthetized with ketamine and xylazine, and a Sylastic catheter (Dow Corning, Midland, Mich) was inserted into the right external jugular vein. The catheter was tunneled under the skin, exteriorized in the back of the neck.

2.3.3. Chemical sympathectomy

Immediately after recovery of the jugular vein cannulation, rats were injected with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (100 mg/Kg) (Minson et al., 1986; Stocker et al., 2006) into the jugular vein. After surgery, they were kept in individual cages having free access to food and water and were allowed a 1-day recovery period before the experiment took place.

2.3.4. Aortic perivascular adipose tissue (PVAT)

PVAT was obtained from thoracic aorta artery and maintained in 1 mL of Krebs solution (composition, in mmol/L: NaCl 130.0; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 14.9; C₆H₁₂O₆ 5.5; CaCl₂ 1.6), pH 7.4, supplied with gas containing 95% O₂ and 5% CO₂ at

37°C. After this time, Krebs solution was exchanged and stimulation with NE (0.1 µM) or/and LPS (1 µg/mL) was initiated for 1 h. After stimulation, the Krebs solutions were collected and were called “PVAT’s products”. “PVAT’s products” were used as stimulus for VSMC culture and were used for TNF-α and NOx analyzes.

2.3.5. Vascular smooth muscle cells culture

A primary culture of rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) was obtained as described by Chi et al. (2017). Before the experiments, the VSMCs were cultured in serum-free medium for 24 h. VSMC (10⁴ cells/well) were incubated with FLUO-3AM (10 µmol/L) for 30 min before stimulus with “PVAT’s products” in presence or absence of TEA (100 µM).

2.4. Drug administration

Rats were randomly separate in different experimental groups according to drugs received. Drugs were administered to the animals, alone or in combination, according to the following chronology: (a) 6-OHDA or acid ascorbic solution (10 %) was injected into the jugular vein 24 h before A779 (3 nmol in 2 µL) or Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 µL); (b) A779 was injected inside the right lateral ventricle (icv) 30 min before Ang-(1-7); (c) Ang-(1-7) was injected inside the right lateral ventricle 1 min before LPS (1.5 mg/kg) administration; (d) LPS was injected into the jugular vein after Ang-(1-7) icv administration. Control animals only received equal volumes of saline 0.9% (vehicle) through the same routes.

2.5. Obtaining of the samples

Samples of blood and tissues (spleen, liver and thoracic aorta) were collected 1 h, while heart was collected 6 h after LPS administration. Part of the blood was collected with EDTA (1 mM) and was immediately centrifuged (3100 rpm, 4 °C, 15 min) to obtain plasma, which was stored in a freezer at -80 °C. Another part of blood was collected without anticoagulant and centrifuged (3500 rpm, 4°C, 10 min) to obtain serum, which was also stored in a freezer at -80 °C. The tissues were collected, washed with sterile saline (0.9 %) and were immediately frozen in dry ice and stored at -80 °C.

2.6. Techniques

2.6.1. Blood-brain barrier permeability

The integrity of the blood-brain barrier (BBB) was investigated using Evans blue dye extravasation 2 h after the LPS administration. Following sedation with ketamine and xylazine (90 mg/kg and 9 mg/kg), the animals received an intravenous injection of 1 ml of Evan's blue solution (2 % w/v diluted in saline solution 0.9 %). After 1 h, the rats were perfused with 200 ml of 0.9 % saline solution and the brain was collected for hypothalamus dissection. Hypothalamic samples were homogenized in 50 % trichloroacetic acid, centrifuged at 10000 rpm at 4 °C during 20 min, and the supernatant was diluted in ethanol 1:1 (v/v). Evans blue content was measured by spectrophotometry (Synergy H1, Biotek) at 630 nm and quantified according to a standard curve. The results are presented as (ng of Evans blue stain/mg of protein).

2.6.2. Cytokine measurement by ELISA

Serum was diluted with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and tissues (spleen, liver, PVAT and heart) were homogenized in PBS containing protease inhibitors followed by centrifugation (10000 rpm, 4 °C, 10 min) to collect the supernatant. The supernatant was diluted with appropriate buffer and the levels of IL-1 β (catalog # RLB00), IL-6 (catalog # R6000B) and IL-10 (catalog # R1000) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), and TNF- α (catalog 438206) level was quantified by ELISA using kit from Biolegend (San Diego, CA, USA) according to the user manual. The results were expressed as cytokines concentration in pg·mL⁻¹ for serum and pg·mg protein⁻¹ based on standard curves.

2.6.3. Plasma nitrite/nitrate (NOx) measurement

Tissues (spleen, liver and thoracic aorta) were homogenized in PBS containing protease inhibitors followed by centrifugation (10000 rpm, 4 °C, 10 min) to collect the supernatant. The supernatant and plasma were deproteinized using cold absolute ethanol and were injected in a reaction vessel containing vanadium trichloride (VCl₃). The nitrite/nitrate produced was detected as ozone induced by chemiluminescence using the purge system from Sievers Instruments Nitric Oxide Analyzer (NOA model 280i; Boulder, Colo). The results were expressed as NOx concentration in $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ for plasma and $\mu\text{M}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ based on standard curves.

2.6.4. Radioimmunoassay for corticosterone and vasopressin (AVP)

The corticosterone and AVP radioimmunoassay was performed as previously described in Vecsei (1979). Plasma samples (25 μL) were extracted using ethanol, lyophilized,

and stored at -20 °C until analysis of corticosterone. Plasma samples (0.5 mL) were extracted using the acetone/petroleum ether method, lyophilized, and stored at -20 °C until analysis of AVP. Assay sensitivity and intra- and interassay coefficients of variation were 0.4 µg.dL⁻¹, 3.3 % e 10.0 % for corticosterone and 0.7 pg.mL⁻¹, 7.6 % and 12 % for AVP. The results were expressed as µg.dL⁻¹ for corticosterone and pg.mL⁻¹ for AVP.

2.6.5. Vascular reactivity on aorta artery

After 1 h of experiments of drug administration, the thoracic aorta of each animal was removed, dissected, and sectioned in 4- mm rings. The rings were kept in two stainless steel stirrups and connected to an isometric force transducer (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) in a chamber containing Krebs solution (composition, in mmol/L: NaCl 130.0; KCl 4.7; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 14.9; C₆H₁₂O₆ 5.5; CaCl₂ 1.6), pH 7.4, supplied with gas containing 95% O₂ and 5% CO₂ at 37 °C. Each ring was stretched to a resting tension of 1.5 g, which was maintained for 60 min for stabilization. Next, the rings were stimulated with phenylephrine (0.1 µmol/L), and the presence or absence of endothelium was verified by using acetylcholine (1 µmol/L). Cumulative concentration-effect curves were constructed for NE (0.1nmol/L - 10µmol/L) in presence or absence of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (100 µmol/L), TEA (100 µmol/L) and AVP (1 nM/L).

2.6.6. Mean arterial blood pressure and heart rate measurement

On the day of the experiment, the arterial catheter was connected to a pressure transducer (TSD104A) and a data acquisition unit (MP150 System; BIOPAC Systems Inc, Goleta, Calif) to record the mean blood pressure and heart rate (HR) of conscious and freely

moving rats. The data were converted and analyzed using the software AcqKnowledge v.3.9.0 (BIOPAC Systems Inc, Goleta, Calif).

2.6.7. Intracellular Ca²⁺ measurement in VSMCs by fluorescence analysis

To determine [iCa²⁺], the cells were stimulated with the selective α 1-adrenergic receptor agonist phenylephrine (10 μ mol/L) for 5 min. Then, the cells were stimulated with “PVAT’s products” for 30 min. Fluorometric analyses were performed on a spectrofluorometer (BioTeK®) equipped with a 150-Watt Xenon lamp (Excitation/Emission: FLUO-3AM 506/526 nm). All the measurements were carried out at medium sensitivity.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 8.0 (GraphPad) software. Cytokines, NOx corticosterone and AVP measurement were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-keuls multiple comparison post-hoc test. PAM and HR were statistically analyzed by two-way ANOVA followed by the Newman-keuls multiple comparison post-hoc test. BBB permeability was analyzed by *t*-Student followed by the Newman-keuls multiple comparison post-hoc test. The maximum effect (E_{max}) was considered as the maximal amplitude response reached in the concentration–effect curves for the contractile agent. The concentration of agents that produced a half-maximal relaxation amplitude (EC₅₀) was determined after logit transformation of the normalized concentration–response curves and it is reported as negative logarithm (pD₂) of the mean of individual values. The experimental sample n refers to the number of animals and data are expressed as

the means \pm standard error of the mean (SEM). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Endotoxemic model did not modified BBB permeability

The BBB permeability was not altered during endotoxemia as compared to control group (Fig. 1).

3.2. Central Ang-(1-7)/Mas receptor axis, attenuated systemic inflammation via efferent sympathetic reflex

We first verified whether LPS induced a systemic inflammation through the analysis of peripheral cytokines and NO_x levels. LPS increased TNF- α , IL-1 β and IL-6 serum concentration, and decreased IL-10 levels, as well as increase NO_x plasma concentration. Our results validate the peripheral inflammation LPS-induced. In addition, we also performed chemical performed chemical sympathectomy to analyze whether central Ang-(1-7)/Mas receptor axis regulates sympathetic anti-inflammatory reflex. Central Ang-(1-7) administration, via Mas receptor, reduced the peripheral inflammation markers and this response was attenuated by the sympathetic block (Fig. 2A-D, Fig. 3). There was no significant difference between groups control and A779 + Saline + Saline and ODHA + ascorbic acid in TNF- α (non-detected values through commercial kits), IL-1 β (43.69 *versus* 38.75 and 40.50 pg/mL, respectively), IL-6 (53.41 *versus* 64.19 and 58.20 pg/mL,

respectively), IL-10 (9.95 *versus* 8.48 and 10.19 pg/mL, respectively) and NOx (16.91 *versus* 19.96 and 17.21 μ M/mL, respectively) levels (Data not shown).

Considering that there is the important humoral pathway to control of inflammation, we evaluate the corticosterone and AVP plasma concentration. LPS increased corticosterone and AVP levels and these effects did not alter by Ang-(1-7) and by blockade of Mas receptor, reinforcing the idea that the heptapeptide mainly work through the neural pathway (Fig. 4A-B). There was no significant difference between groups control and A779 + Saline + Saline in corticosterone plasmatic concentration (14.88 *versus* 14.50 μ g/dL, respectively) (Data not shown).

Next, we investigated the TNF- α , IL-10 and NOx levels - considering that important effect of Ang-(1-7) on these cytokines levels in this study - on spleen and liver. The liver and, in special, spleen are important organs to control systemic inflammation. In this study, the sympathetic pathway of inflammatory reflex was modulated by Ang-(1-7) and attenuated the tissue inflammation (Fig. 5-6), thereby helping to reducing the global inflammation. There was no significant difference between groups control and A779 + Saline + Saline and ODHA + ascorbic acid in TNF- α (2.059 *versus* 1.50 and 1.74 pg/mg of protein, respectively), IL-10 (22.01 *versus* 16.45 and 17.41 pg/mg of protein, respectively) and NOx (12.38 *versus* 12.40 and 15.95 μ M/mg of protein, respectively) levels on spleen; and TNF- α (79.03 *versus* 78.62 e 77.66 pg/mg of protein, respectively), IL-10 (64.01 *versus* 59.44 and 58.50 pg/mg of protein, respectively) and NOx (7.60 *versus* 7.21 and 5.56 μ M/mg of protein, respectively) levels on liver (Data not shown).

3.3. LPS stimulation induced NOx and TNF- α secretion by PVAT

PVAT is a tissue that can be affected during systemic inflammation, taking the important damages to vascular function. PVAT stimulated with LPS had increased TNF- α and NOx secretion and decrease IL-10 serum concentration. In presence of NE there was reduction in production of pro-inflammatory and increased anti-inflammatory mediators LPS-induced (Fig. 7A-C).

3.4. Central Ang-(1-7) attenuated NOx production in thoracic aorta and was restored the vascular responsiveness in endotoxemic rats

Figure 8 shows that Ang-(1-7) reduced NOx production in thoracic aorta LPS-induced through modulation of sympathetic efferent axis of inflammatory reflex, because the chemical sympathectomy abolished this effect. There was no significant difference between groups control and ODHA + ascorbic acid in NOx plasma concentration (7.60 *versus* 7.21 $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, respectively) (Data not shown).

Figure 9 (Table 1) shows that LPS decreased NE maximum constrictor effect (E_{max}) as compared to control group and this effect was PVAT-dependent. We also show that LPS effects on vascular function was NO and hyperpolarization-dependent, which L-NAME and TEA intensified E_{max} induced by NE in endotoxemic rats (Fig. 10B-C, Tables 3-4). The presence of Ang-(1-7) increased NE E_{max} as compared to the response induced by LPS (Fig. 10A, Table 2). Also, the addition of AVP, *in vitro*, did not alter the drop of vasoconstriction induced by LPS and did not affect the Ang-(1-7) response (Fig. 10D, Table 5).

3.5. “PVAT’s product” decrease $[\text{iCa}^{+2}]$ through hyperpolarization in response to LPS stimulation

The opening up of potassium channels can affect the cytoplasmic Ca^{2+} levels. Considering the participation of potassium channels in vascular response LPS-induced, we examined how LPS and NE affect VSMCs pre-loaded with Fluo-3 AM, as well as their effect on Ca^{2+} levels after stimulation with phenylephrine. LPS stimulation decreased $[\text{iCa}^{2+}]$, but in association with NE restore Ca^{2+} levels (Fig. 11A). TEA restore the $[\text{iCa}^{2+}]$ in VSMC stimulated with LPS (Fig. 11B).

3.6. Ang-(1-7) restored drop on mean blood pressure in endotoxemic rats

In this *in vivo* protocol, we verified that mean blood pressure was restored by Ang-(1-7) without affecting the tachycardia LPS-induced (Fig. 12A-B).

3.7. Ang-(1-7) attenuated TNF- α production in heart LPS-induced

In figure 13, we observed that central administration of Ang-(1-7) was able to attenuate cardiac TNF- α level in rats 6 h after LPS administration.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated, for the first time, that central Ang-(1-7) administration attenuate the peripheral inflammation by modulation of sympathetic efferent arm of the anti-inflammatory reflex in endotoxemic rats. Taken together, these data suggest that central Ang-(1-7), via Mas receptor, control the sympathetic component of inflammatory reflex and exerted the anti-inflammatory effect on spleen, liver and PVAT resulting in

recovery of vascular responsiveness and hypotension can be responsible for improves on survival in rats treated with LPS.

Onset of peripheral inflammation is characterized by the amplified production of pro-inflammatory cytokines - and other inflammatory mediators - by activation of innate immune cells such as macrophages (Andersson, Tracey, 2012). In our study, we demonstrated the inflammatory response LPS-induced by increase pro-inflammatory cyotkines and NOx levels, with no changes in blood brain barrier permeability.

The immune system activation occurs, in order to eliminate the causative agent and restoration of homeostasis (Andersson, Tracey, 2012). In this context, the vagal afferents fibers can detect peripheral inflammation LPS-induced and transmit the inflammatory signals for to nucleus of the solitary tract (NTS) (Elmquist et al., 1993). Neurons of the NTS projected for rostral ventrolateral medulla (RVLM) and the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), resulting in HPA axis and autonomic efferent arc of inflammatory reflex activation. HPA axis activation resulting in glucocorticoid release by the adrenal cortex with well-known anti-inflammatory properties while autonomic arc activation promotes the release of NE for control the systemic inflammation (Borovikova et al., 2000; Andersson, Tracey, 2012; Martelli et al., 2014; Pavlov, Tracey, 2017). In our study, it was observed that Ang-(1-7) has not changed the corticosterone levels LPS-induced, agreeing with Regenhardt et al. (2013), who have demonstrated that central infusions of Ang-(1-7) had no effect on serum corticosterone levels in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Ang-(1-7) also did affect AVP plasma concentration, a potent activator of HPA axis, in endotexemic rats. Also, Ang-(1-7) decreased peripheral pro-inflammatory mediators production in rats submitted to endotoxemia, however this systemic anti-inflammatory effect was blocked by A779 and in rats underwent chemical sympathectomy. In addition, the Mas receptor protein expression was identified in RVLM and PVN (Metzger et al., 1995; Becker et al., 2007).

Thus, may suggest that the peripheral anti-inflammatory effects of Ang-(1-7)/Mas receptor axis in endotoxemic rats mainly involve an autonomic modulation.

Currently, it has been investigated the participation of sympathetic efferent component of inflammatory reflex in system immune modulation in inflammatory experimental models (Rosas-Ballina et al., 2015). Recent studies emphasize the therapeutic potential of sympathetic efferent arm of inflammatory reflex in endotoxemia (Rosas-Ballina et al., 2015). Specifically, in response to LPS the efferent arm this the neuro-immune circuit was proposed as a splanchnic nerve preganglionic efferent neuron terminating in the celiac ganglia, with postganglionic sympathetic fibers - the splenic nerve - projecting into the spleen (Rosas-Ballina et al., 2008; Jung, Levesque, Ruitenber, 2017; Martelli et al., 2019). Other studies also demonstrate similar results, where, in response to bacterial endotoxin, splanchnic sympathetic and splenic nerve activity increased and that efferent sympathetic nerve activity was responsible for suppression of inflammatory signaling in the spleen (MacNeil et al., 1996; Gautron et al., 2013). The splenic nerve has sympathetic input to β 2-adrenergic receptors on cholinergic T cells causing the release of ACh then elicits an anti-inflammatory response by stimulation of α 7nAChRs on splenic macrophages (Martelli et al., 2014; Pavlov, Tracey, 2017). Interestingly, the spleen has been described as the main source of TNF- α during endotoxemia. In the present study, the intensification of pro-inflammatory cytokines production in the spleen and liver, other important source of cytokines – with chemical sympathectomy in endotoxemic rats. In addition, it has been shown, for the first time, attenuation of anti-inflammatory tissue response of Ang-(1-7) in response of LPS.

The sympathetic efferent arc of inflammatory reflex can also modulates the functioning of PVAT and influences the vascular function (Mikolajczyk et al., 2016; Guzik et al., 2017). Electrophysiological studies, showed that PVAT has a sympathetic innervation (Egawa; Yoshimatsu; Bray, 1989). In the past, the sympathetic activation was only related to

thermogenesis, however, in our days, related to inflammatory response control (Saxton et al., 2018). In endotoxemia, Creely et al. (2007) showed that LPS systemic administration induces cytokines and NO production by PVAT. Our findings agree with these previous studies showed increase of TNF- α e NO production by PVAT in response to LPS. Considering the indirect effect of Ang-(1-7), we stimulated PVAT with NE, in presence of LPS, a reduction of inflammatory mediators was observed. Also showed that Ang-(1-7) attenuated NOx production in thoracic aorta LPS-induced and this effect was blocked with chemical sympathectomy, suggesting that this central heptapeptide can also control the inflammatory response in PVAT.

The pro-inflammatory mediators production by PVAT may affect vascular function. Thiernemann et al. (1993), showed that TNF- α can decrease vascular responsiveness through NO production in aorta. In addition, Hai-Mei et al. (2013) complemented these findings showing that, in endotoxemia, reduction in aorta vascular responsiveness is dependent of NO production PVAT-induced. Similarly, we observed that rings of thoracic aorta artery have presented low resistance in response to NE and this effect was dependent of NO production-PVAT induced and hyperpolarization-dependent in endotoxemic rats, while Ang-(1-7) central administration was restored the vascular responsiveness. The addition of vasoconstrictor hormone vasopressin (AVP) not sufficient to restore the low resistance in response to NE in aorta of endotoxemic rats.

NO production can alter the functioning of the potassium channels localized in vascular smooth muscle cells (O'Brien et al., 2009). In inflammation models, the NO can to induce hyperpolarization and to open the calcium-activated potassium channels. The opening of calcium-activated potassium channels reduces $[Ca^{+2}]_i$ and induces vascular relaxation. In the present study, using vascular smooth muscle cells (VSMC) culture we observed that NOx and TNF- α PVAT production induced by LPS (for 1 h) may have caused decrease of calcium

(Ca⁺²) cytoplasmatic concentration and this would explain the low resistance in response to NE. NE and LPS stimulation have reduced proinflammatory effect of LPS on PVAT and increased the intracellular Ca⁺² concentration ([iCa⁺²]) in VSMC, suggesting that Ang-(1-7) restore the vascular responsiveness by sympathetic autonomic modulation in endotoxemia.

Alterations in vascular function may lead to blood pressure and heart rate alterations during inflammatory response. In endotoxemia, previous studies carried out in our laboratory showed that hypotension induced by LPS is NO-dependent (Stabile et al., 2007; Batalhão et al., 2008; Saia et al., 2013). Considering the intense production of NO observed in our study, can suggesting that hypotension induced by LPS to be NO dependent and Ang-(1-7) restore this response, without affecting the tachycardia, exercising anti-inflammatory effects on PVAT and decrease TNF- α cardiac level. In addition to vascular effects, TNF- α decrease cardiac contractility and ejection fraction (Schulz et al., 1995; Kumar et al., 1966; Cain et al., 1999; Kumar et al., 2007). In our study, TNF- α cardiac reduction may have increased cardiac contractility and ejection fraction, leading to improve in cardiac output and PAM, without affecting the high HR observed in endotoxemic rats.

However, these are the first findings and new studies are being performed by to understand where and how Ang-(1-7) acts in CNS to activate of sympathetic component of inflammatory reflex in endotoxemic models. Previously, immunohistochemical colocalization studies have demonstrated a wide distribution of Mas receptor in CNS (Metzger et al., 1995; Becker et al., 2007). The presence of Mas receptor on microglia, neurons and endothelial cells suggests that Ang-(1-7) may modulate these cells activity in CNS to induce peripheral effects in inflammation. As a first step, central Ang-(1-7) can be reported as a potential new target in control of systemic inflammation. It is also important to emphasise the potential of Ang-(1-7) for clinical use is further evidenced by the number of on-going clinical trials involving this heptapeptide (Machado-Silva et al., 2016; Rodrigues Prestes et al., 2017).

Taken together, these data suggest that Ang-(1-7), via Mas receptor, control the sympathetic component of inflammatory reflex and exerted an anti-inflammatory effect on spleen, liver and PVAT resulting in recovery of vascular responsiveness and hypotension in rats treated with LPS.

References

- Abe, C., Inoue, T., Inglis, M.A., Viar, K.E., Huang, L., Ye, H., Rosin, D.L., Stornetta, R.L., Okusa, M.D., Guyenet, P.G., 2017. C1 neurons mediate a stress-induced anti-inflammatory reflex in mice. *Nature Neuroscience* 20, 700–707. DOI: 10.1038/nn.4526.
- Andersson U, Tracey KJ. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med.* 2012 Jun 4; 209(6):1057-68. DOI: 10.1084/jem.20120571.
- Bassi, G.S., Dias, D.P.M., Franchin, M., Talbot, J., Reis, D.G., Menezes, G.B., Castania, J.A., Garcia-Cairasco, N., Resstel, L.B.M., Salgado, H.C., Cunha, F.Q., Cunha, T.M., Ulloa, L., Kanashiro, A., 2017. Modulation of experimental arthritis by vagal sensory and central brain stimulation. *Brain, Behavior, and Immunity*. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.04.003
- Barnes KL, Knowles WD, Ferrario CM. Angiotensin II and angiotensin-(1–7) excite neurons in the canine medulla in vitro. *Brain Res. Bull.* 1990 Feb; 24(2):275-80. DOI: 10.1016/0361-9230(90)90215-L.
- Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the reninangiotensin system. *Hypertension.* 2001; 38: 1246-1249. DOI: 10.1161/hy1201.101214.
- Batalhão ME, Moreto V, Stabile AM, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC. Role of dexamethasone on vasopressin release during endotoxemic shock. *Regul Pept.* 2008 Apr 10;147(1-3):67-71. DOI: 10.1016/j.regpep.2008.01.001.
- Becker LK, Etelvino GM, Walther T, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293:H1416–1424. DOI: 10.1152/ajpheart.00141.2007.
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., Dinarello, C.A., 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science (New York, N.Y.)* 233, 652–4. DOI: 10.1126/science.3014662.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000; May 25;405(6785):458-62. DOI: 10.1038/35013070.

- Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken AH. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med*. 1999 Jul;27(7):1309-18.
- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos R AS, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am. J. Physiol*. 1989 Jul; 257(1 Pt 2):H324-9. DOI: 10.1152/ajpheart.1989.257.1.H324.
- Chi J, Meng L, Pan S, Lin H, Zhai X, Liu L, Zhou C, Jiang C, Guo H1. Primary Culture of Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells: A New Method. *Med Sci Monit*. 2017 Aug 19;23:4014-4020. DOI: 10.12659/MSM.902816.
- Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher fM, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Mar;292(3):E740-7. DOI: 10.1152/ajpendo.00302.2006.
- Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. Effects of 2-deoxy-D-glucose on sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue. *Am J Physiol*. 1989 Dec;257(6 Pt 2):R1377-85. DOI: 10.1152/ajpregu.1989.257.6.R1377.
- Elmquist JK, Ackermann MR, Register KB, Rimler RB, Ross LR, Jacobson CD. Induction of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following *Pasteurella multocida* endotoxin administration. *Endocrinology*. 1993 Dec;133(6):3054-7. DOI: 10.1210/endo.133.6.8243337.
- Gautron L, Rutkowski JM, Burton MD, Wei W, Wan Y, Elmquist JK. Neuronal and nonneuronal cholinergic structures in the mouse gastrointestinal tract and spleen. *J Comp Neurol*. 2013 Nov;521(16):3741-67. DOI: 10.1002/cne.23376.
- Geara AS, Azzi J, Jurewicz M, Abdi R. The renin-angiotensin system: an old, newly discovered player in immunoregulation. *Transplant Rev*. 2009; 23: 151-8. DOI: 10.1016/j.trre.2009.04.002.
- Gironacci MM, Longo Carbajosa NA, Goldstein J, Cerrato BD. Neuromodulatory role of angiotensin-(1-7) in the central nervous system. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Jul 1; 125(2):57-65. DOI: 10.1042/CS20120652.
- Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc Res*. 2017 Jul 1;113(9):1009-1023. DOI: 10.1093/cvr/cvx108.
- Hai-Mei L, Song-Yin H, Run-Mei L, Xiao-Huang X, Le-Quan Z, Xiao-Ping L, Jin-Wen X. Andrographolide protects against lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity by suppressing the expression of inducible nitric oxide in periaortic adipose. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013 Aug;62(2):154-9. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31829497ea.
- Jung WC, Levesque JP, Ruitenberg MJ. It takes nerve to fight back: The significance of neural innervation of the bone marrow and spleen for immune function. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Jan; 61:60-70. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.08.010.

- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):949-58.
- Kumar A, Paladugu B, Mensing J, Kumar A, Parrillo JE. Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms are involved in TNF-alpha -induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 May;292(5):R1900-6. DOI: 10.1152/ajpregu.00146.2006.
- Machado-Silva A, Passos-Silva D, Santos RA, Sinisterra RD. Therapeutic uses for Angiotensin-(1-7). *Expert Opin Ther Pat*. 2016 Jun; 26(6):669-78. DOI: 10.1080/13543776.2016.1179283.
- MacNeil, B.J., Jansen, A.H., Greenberg, A.H., Nance, D.M. Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. *Am J Physiol*. 1996 Jan; 270(1 Pt 2):R264-70. DOI: 10.1152/ajpregu.1996.270.1.R264.
- Martelli D, Yao ST, Mancera J, McKinley MJ, McAllen RM. Reflex control of inflammation by the splanchnic anti-inflammatory pathway is sustained and independent of anesthesia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Nov 1; 307(9):R1085-91. DOI: 10.1152/ajpregu.00259.2014.
- Martelli D, Farmer SGS, McKinley MJ, Yao ST, McAllen RM. The anti-inflammatory reflex action of the splanchnic sympathetic nerves is distributed across abdominal organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2019 Mar 1; 316(3):R235-R242. DOI: 10.1152/ajpregu.00298.2018.
- Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett*. 1995 Jan 2;357(1):27-32. DOI: 10.1016/0014-5793(94)01292-9.
- Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, Sagan A, Wu J, Vinh A, Marvar PJ, Guzik B, Podolec J, Drummond G, Lob HE, Harrison DG, Guzik TJ. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J*. 2016 May;30(5):1987-99. DOI: 10.1096/fj.201500088R.
- Minson J, Chalmers J, Kapoor V, Cain M, Caon A. Relative importance of sympathetic nerves and of circulating adrenaline and vasopressin in mediating hypertension after lesions of the caudal ventrolateral medulla in the rat. *J Hypertens*. 1986 Jun;4(3):273-81.
- O'Brien A, Stidwill RP, Clapp LH, Singer M. Variable effects of inhibiting iNOS and closing the vascular ATP-sensitive potassium channel (via its pore-forming and sulfonylurea receptor subunits) in endotoxic shock. *Shock*. 2009 May;31(5):535-41. DOI: 10.1097/SHK.0b013e31818b99c2.
- Pavlov, VA, Tracey, KJ. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nat Neurosci*. 2017 Feb; 20(2):156-166. DOI: 10.1038/nn.4477.

- Pavlov, V.A., Chavan, S.S., Tracey, K.J., 2018. Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. *Annual Review of Immunology* 36, 783–812. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053158.
- Rosas-Ballina M, Valdés-Ferrer SI, Dancho ME, Ochani M, Katz D, Cheng KF, Olofsson PS, Chavan SS, Al-Abed Y, Tracey KJ, Pavlov VA. Xanomeline suppresses excessive pro-inflammatory cytokine responses through neural signal-mediated pathways and improves survival in lethal inflammation. *Brain Behav Immun.* 2015 Feb;44:19-27. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.07.010.
- Regenhardt RW, Desland F, Mecca AP, Pioquinto DJ, Afzal A, Mocco J, Summers C. Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology.* 2013 Aug; 71:154-63. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.025.
- Rodrigues Prestes, T.R., Rocha, N.P., Miranda, A.S., Teixeira, A.L., Simoes-e-Silva, A.C., 2017. The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research. *Current Drug Targets* 18, 1301–1313. DOI: 10.2174/1389450117666160727142401.
- Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W.R., Ochani, K., Harris, Y.T., Huston, J.M., Chavan, S., Tracey, K.J., 2008. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11008–13. DOI: 10.1073/pnas.0803237105.
- Saia RS, Bertozzi G, Mestriner FL, Antunes-Rodrigues J, Queiróz Cunha F, Cárnio EC. Cardiovascular and inflammatory response to cholecystokinin during endotoxemic shock. *Shock.* 2013 Jan;39(1):104-13. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3182793e2e.
- Santos, R.A.S., e Silva, A.C.S., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.-P., Speth, R., Walther, T., 2003. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 8258–8263. DOI: 10.1073/pnas.1432869100.
- Saxton SN, Ryding KE, Aldous RG, Withers SB, Ohanian J, Heagerty AM. Role of Sympathetic Nerves and Adipocyte Catecholamine Uptake in the Vasorelaxant Function of Perivascular Adipose Tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Apr;38(4):880-891. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.310777.
- Souza, L.L., Costa-Neto, C.M., 2012. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *Journal of Cellular Physiology* 227, 2117–2122. DOI: 10.1002/jcp.22940.
- Souza, L.L., Duchene, J., Todiras, M., Azevedo, L.C.P., Costa-Neto, C.M., Alenina, N., Santos, R.A., Bader, M., 2014. Receptor Mas Protects Mice Against Hypothermia and Mortality Induced By Endotoxemia. *Shock* 41, 331–336. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000115.

- Stabile AM, Moreto V, Antunes-Rodrigues J, Carnio EC. Participation of the inducible nitric oxide synthase on atrial natriuretic peptide plasma concentration during endotoxemic shock. *Regul Pept.* 2007 May 3;140(3):136-41. DOI: 10.1016/j.regpep.2006.12.001.
- Stocker SD, Wilson ME, Madden CJ, Lone U, Sved AF. Intravenous 6-hydroxydopamine attenuates vasopressin and oxytocin secretion stimulated by hemorrhage and hypotension but not hyperosmolality in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Jul;291(1):R59-67. DOI: 10.1152/ajpregu.00772.2005.
- Schulz R, Panas DL, Catena R, Moncada S, Olley PM, Lopaschuk GD. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor- α . *Br J Pharmacol.* 1995 Jan;114(1):27-34.
- Thiemermann C, Wu CC, Szabó C, Perretti M, Vane JR. Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol.* 1993 Sep;110(1):177-82.
- Tsai, H.-J., Liao, M.-H., Shih, C.-C., Ka, S.-M., Tsao, C.-M., Wu, C.-C., 2018. Angiotensin-(1–7) attenuates organ injury and mortality in rats with polymicrobial sepsis. *Critical Care* 22, 269. DOI: 10.1186/s13054-018-2210-y.
- Vecsei P. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone and compounds M. JAFFE (Ed.), *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, Acad. Press. 1979; 767-792.
- Vida, G., Peña, G., Kanashiro, A., Thompson-Bonilla, M.D.R., Palange, D., Deitch, E.A., Ulloa, L., 2011. β 2-adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. *FASEB Journal* 25. DOI: 10.1096/fj.11-191007.
- Viel EC, Lemarié CA, Benkirane K, Paradis P, Schiffrin EL. Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 298(3):H938–44. DOI: 10.1152/ajpheart.00707.2009.
- Zhao Q, Ishibashi M, Hiasa K, Tan C, Takeshita A, Egashira K. Essential role of vascular endothelial growth factor in angiotensin II-induced vascular inflammation and remodeling. *Hypertension.* 2004; 44(3):264–70. DOI: 10.1161/01.HYP.0000138688.78906.6b.
- Zhuo JL, Ferrao FM, Zheng Y, Li XC: New frontiers in the intrarenal renin-angiotensin system: A critical review of classical and new paradigms. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 166, 2013. DOI: 10.3389/fendo.2013.00166.

Figures and tables captions

Figure 1. Assessment of BBB permeability in rats submitted to endotoxemia. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 10 each experimental group.

Figure 2. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) and A779 (3 nmol in 2 μ L) administration on TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) levels in rats 1 h after LPS administration (1.5 mg/Kg) and chemical sympathectomy for 24 h. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 7-18. ND.: not-detected. *p < 0,05 versus control group, #p < 0,05 versus LPS group and &p < 0.05 versus Ang-(1-7) + LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 3. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) and A779 (3 nmol in 2 μ L) administration on NOx plasma concentration in rats 1 h after LPS administration (1.5 mg/Kg) and chemical sympathectomy for 24 h. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 7-18. *p < 0,05 versus control group, #p < 0,05 versus LPS group and &p < 0.05 versus Ang-(1-7) + LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 4. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) and A779 (3 nmol in 2 μ L) administration on corticosterone (A) and AVP (B) concentration in rats 1 h after LPS administration (1.5 mg/Kg). Data are expressed as the means \pm SEM, n = 7-18. *p < 0,05 versus control group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 5. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) administration in TNF- α (A), IL-10 (B) and NOx (C) concentration on spleen of rats 1 h after LPS administration (1.5 mg/Kg) and chemical sympathectomy for 24 h. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 6-9. *p < 0,05 versus control group, #p < 0,05 versus LPS group and &p < 0.05 versus Ang-(1-7) + LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 6. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) administration in TNF- α (A), IL-10 (B) and NOx (C) concentration on liver of rats 1 h after LPS administration (1.5 mg/Kg) and chemical sympathectomy for 24 h. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 8-10. *p < 0,05 versus control group, #p < 0,05 versus LPS group and &p < 0.05 versus Ang-(1-7) + LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 7. Effects of NE (0.1 μ M) stimulation on TNF- α (A), IL-10 (B) and NOx (C) secretion in PVAT exposed to LPS (1 μ g/mL) for 1 h. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 3 (pool of 2 rats each n). * p < 0,05 versus PVAT not-stimulated, # p < 0,05 versus PVAT stimulated with LPS. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 8. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) administration in NOx concentration on thoracic aorta of rats 1 h after LPS administration (1.5 mg/Kg) and chemical sympathectomy for 24 h. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 5. * p < 0,05 versus control group, # p < 0,05 versus LPS group and &p<0.05 versus Ang-(1-7) + LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 9. Effects of systemic LPS administration (1.5 mg/Kg), after 1 h, in vascular reactivity of thoracic aorta artery in presence or absence of PVAT. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 5-12. # p < 0,05 versus LPS without PVAT group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 10. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) administration in vascular reactivity of thoracic aorta artery to NE in absence (A) or presence of L-NAME (B), TEA (C) and AVP (D) in rats 1 h after LPS administration (1.5 mg/Kg). Data are expressed as the means \pm SEM, n = 5-12. * p < 0,05 versus control group, # p < 0,05 versus LPS group and &p<0.05 versus Ang-(1-7) + LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 11. Effects of “PVAT’s products” on [iCa⁺²], in absence (A) or presence of TEA (100 μ M) (B) in VSMC culture for 30 min. Data are expressed as fluorescence intensity, n = 4. # p < 0,05 versus “PVAT product” stimulated with LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 12. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) administration in mean blood pressure (A) and HR (B) in rats submitted to endotoxemia (1.5 mg/Kg) during 6 h. Data are expressed as the means \pm SEM, n = 5-7. * p < 0,05 versus control group, # p < 0,05 versus LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Figure 13. Effects of central Ang-(1-7) (0.3 nmol in 2 μ L) administration in TNF- α concentration on heart of rats 1 h after LPS administration (1.5 mg/Kg). Data are expressed as the means \pm SEM, n = 7-8. * p < 0,05 versus control group and # p < 0,05 versus LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Table 1 - Values of Emax and pD2 obtained from concentration-response curves in response to NE, in absence or presence of PVAT, in thoracic aorta artery rings of rats exposed to LPS.

Table 2 - Values of Emax and pD2 obtained from concentration-response curves in response to NE, in presence of PVAT, in thoracic aorta artery rings of control or endotoxemic rats.

Table 3 - Values of Emax and pD2 obtained from concentration-response curves in response to NE, in presence or absence of L-NAME, in thoracic aorta artery rings of control or endotoxemic rats.

Table 4 - Values of Emax and pD2 obtained from concentration-response curves in response to NE, in presence or absence of TEA, in thoracic aorta artery rings of control or endotoxemic rats.

Table 5 - Values of Emax and pD2 obtained from concentration-response curves in response to NE, in presence or absence of AVP, in thoracic aorta artery rings of control or endotoxemic rats.

Figures

Figure 1

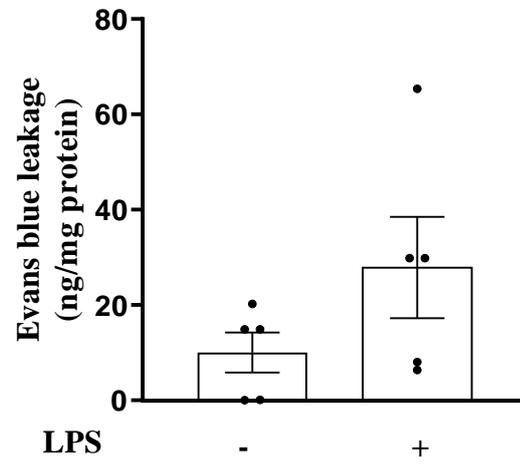


Figure 2

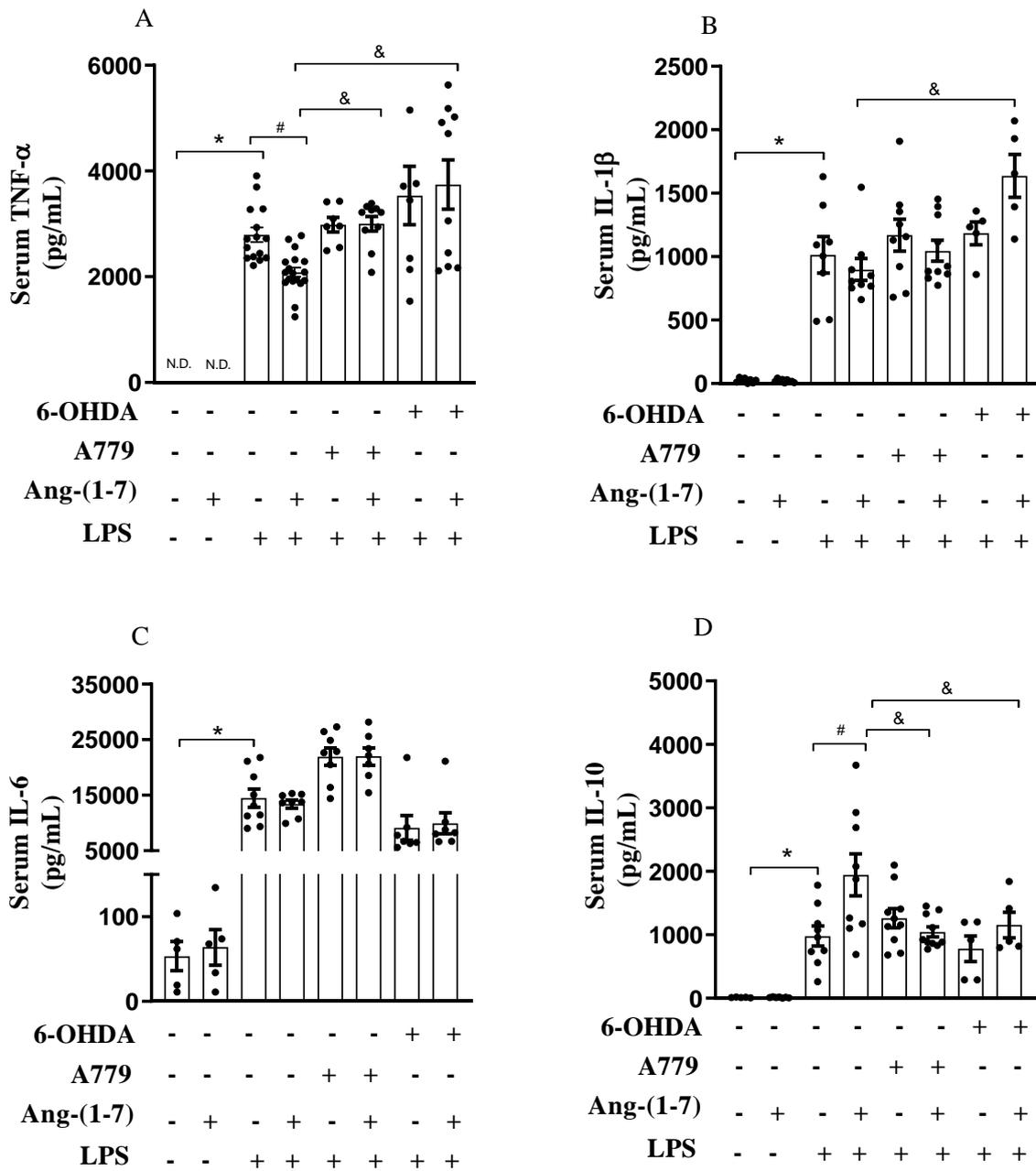


Figure 3

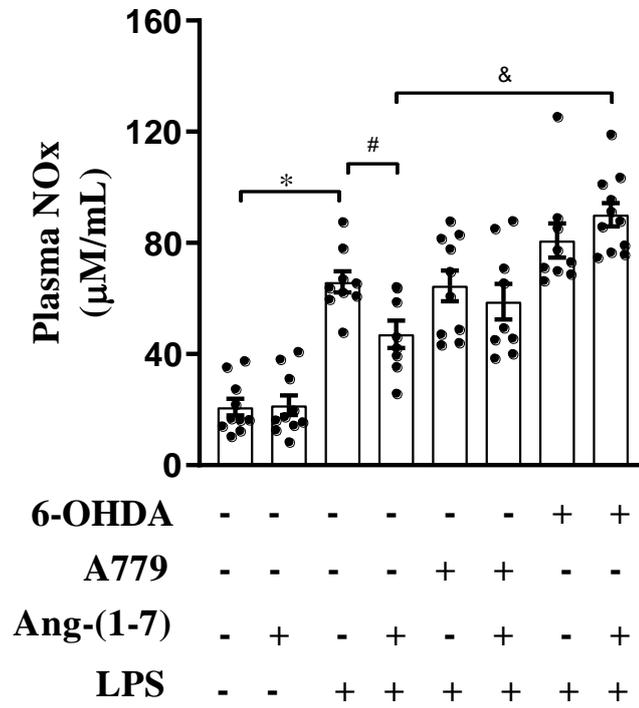


Figure 4

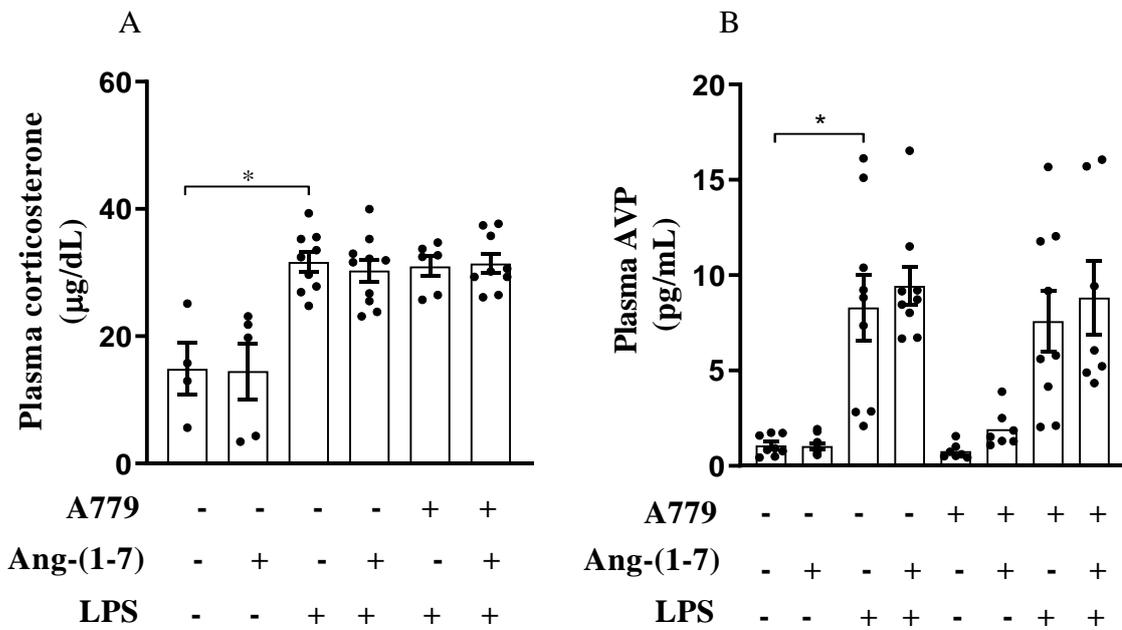


Figure 5

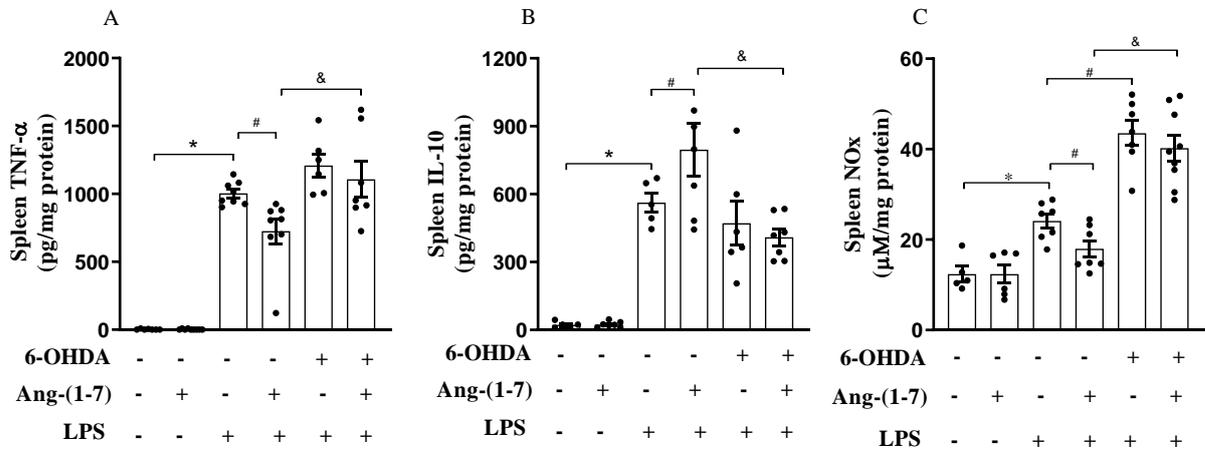


Figure 6

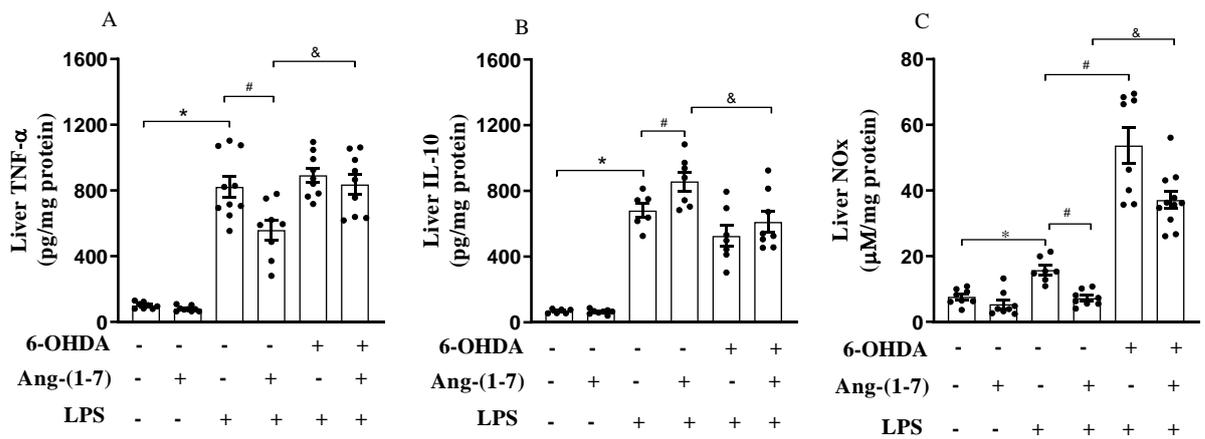


Figure 7

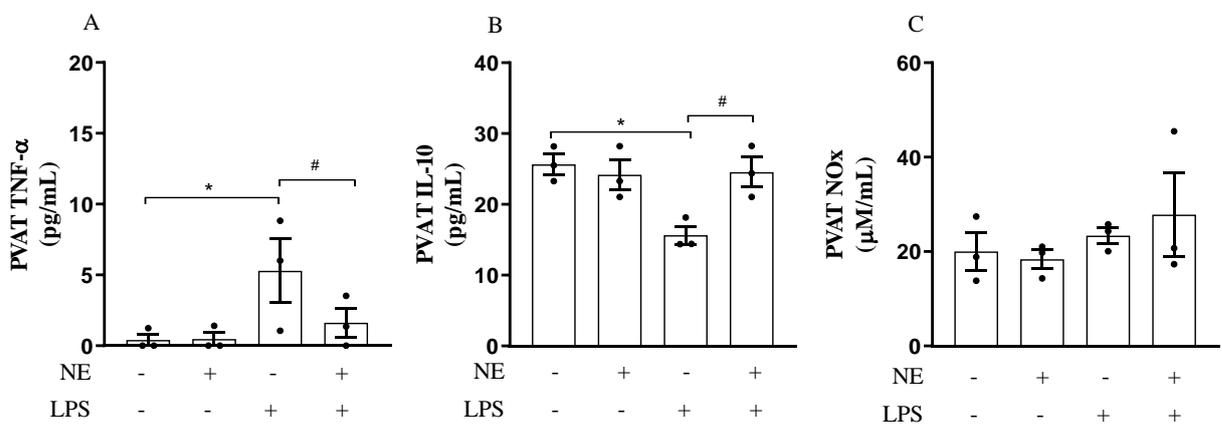


Figure 8

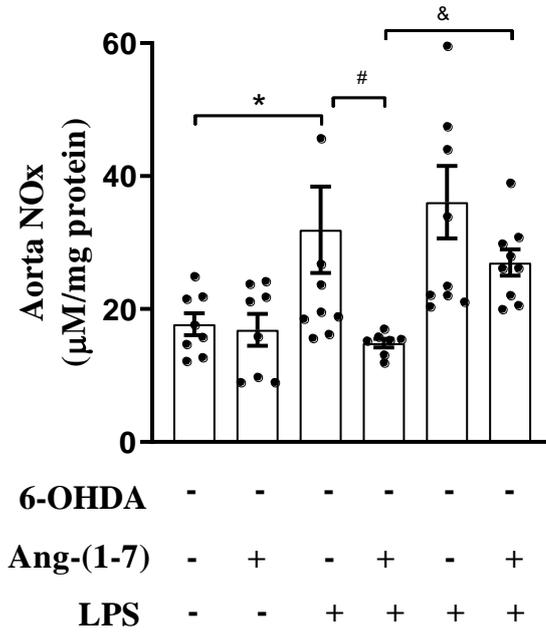


Figure 9

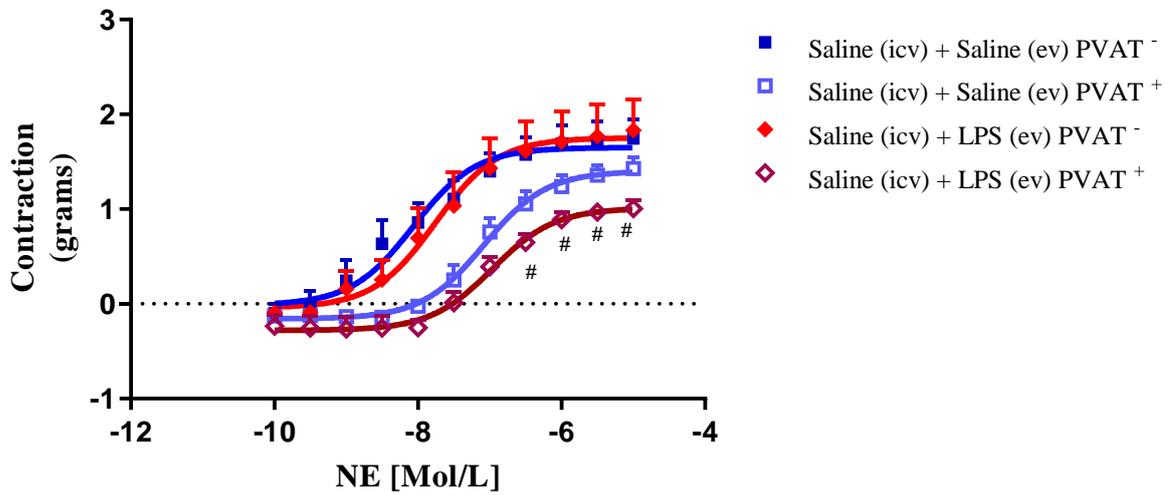


Figure 10

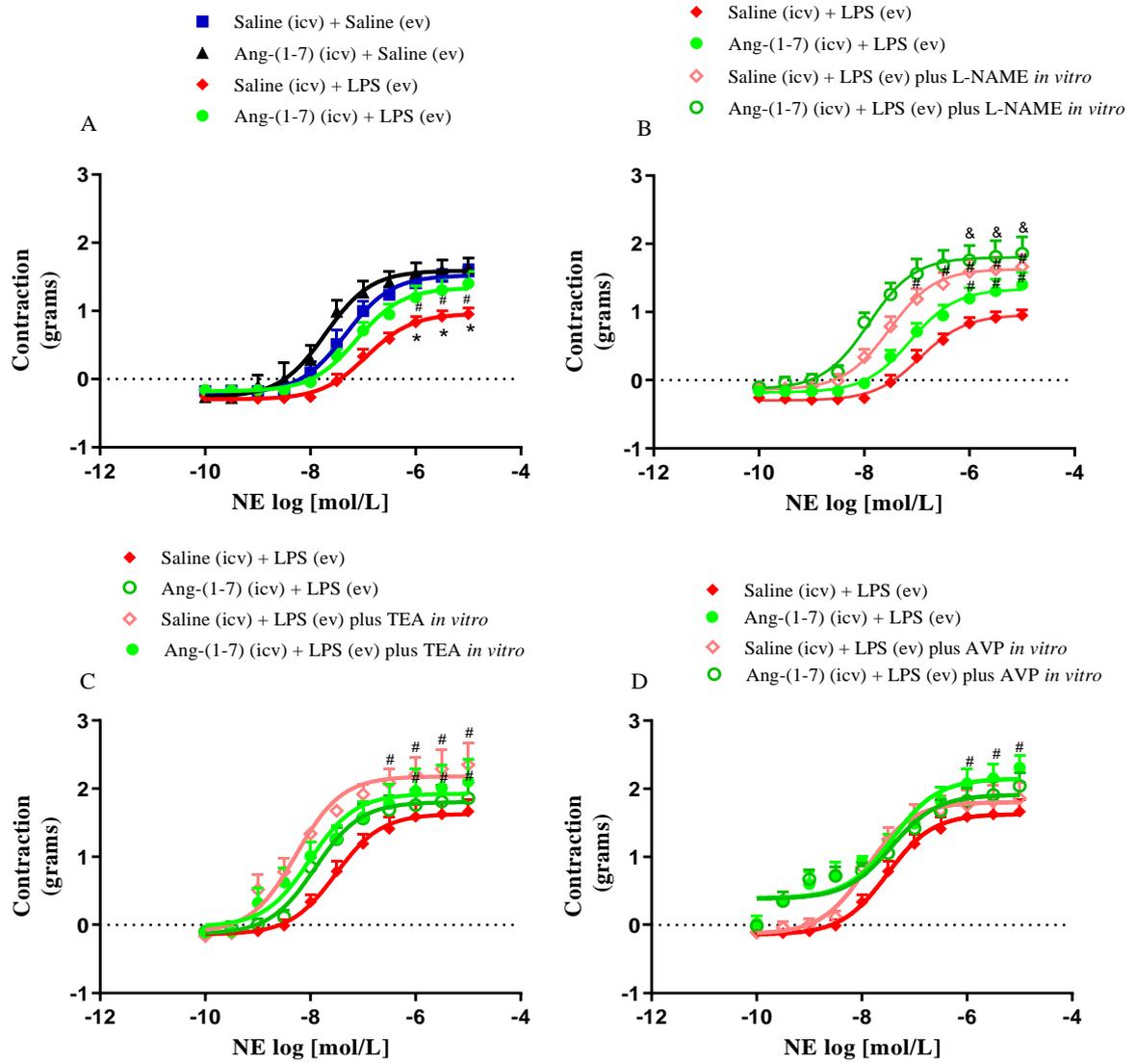


Figure 11

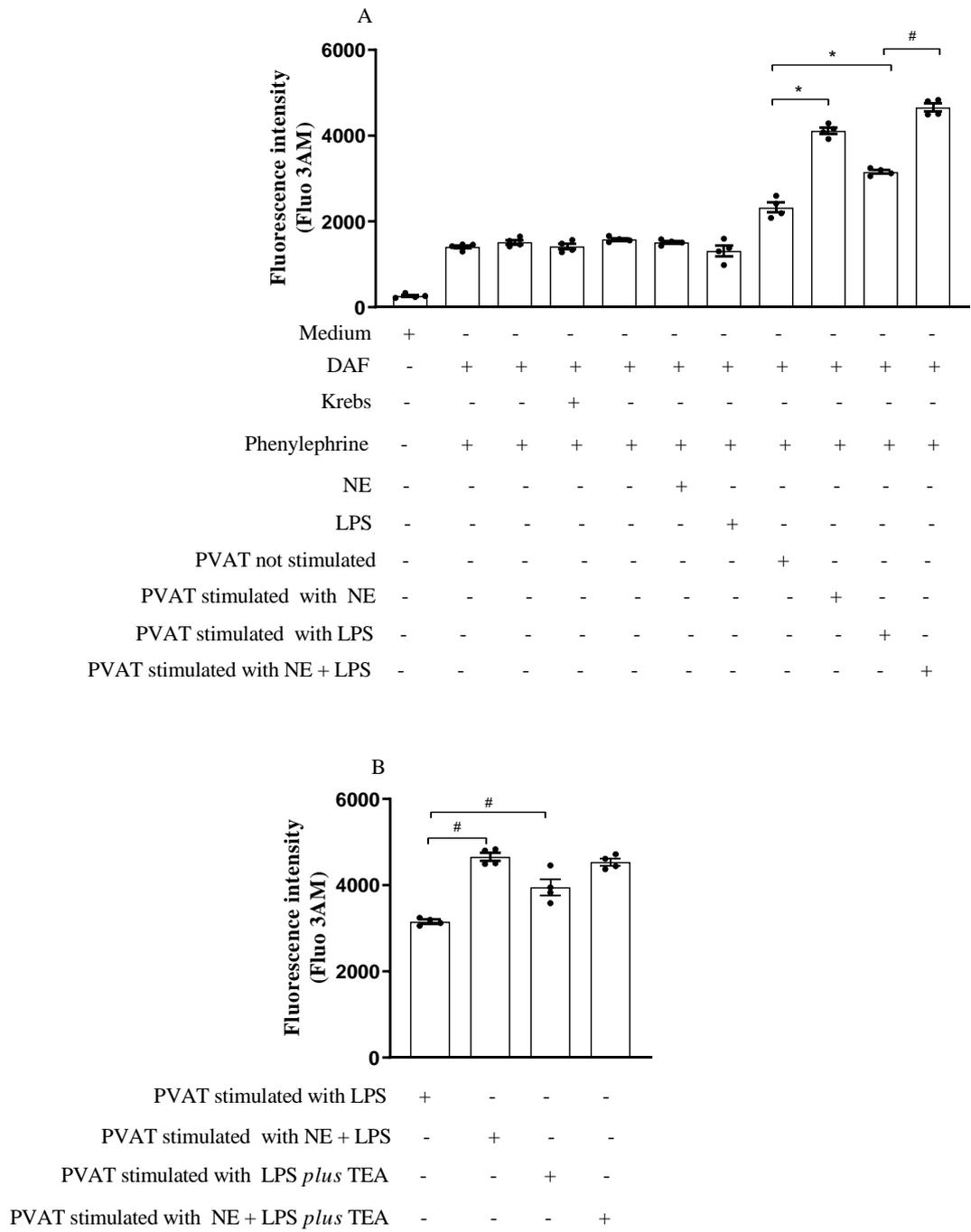


Figure 12

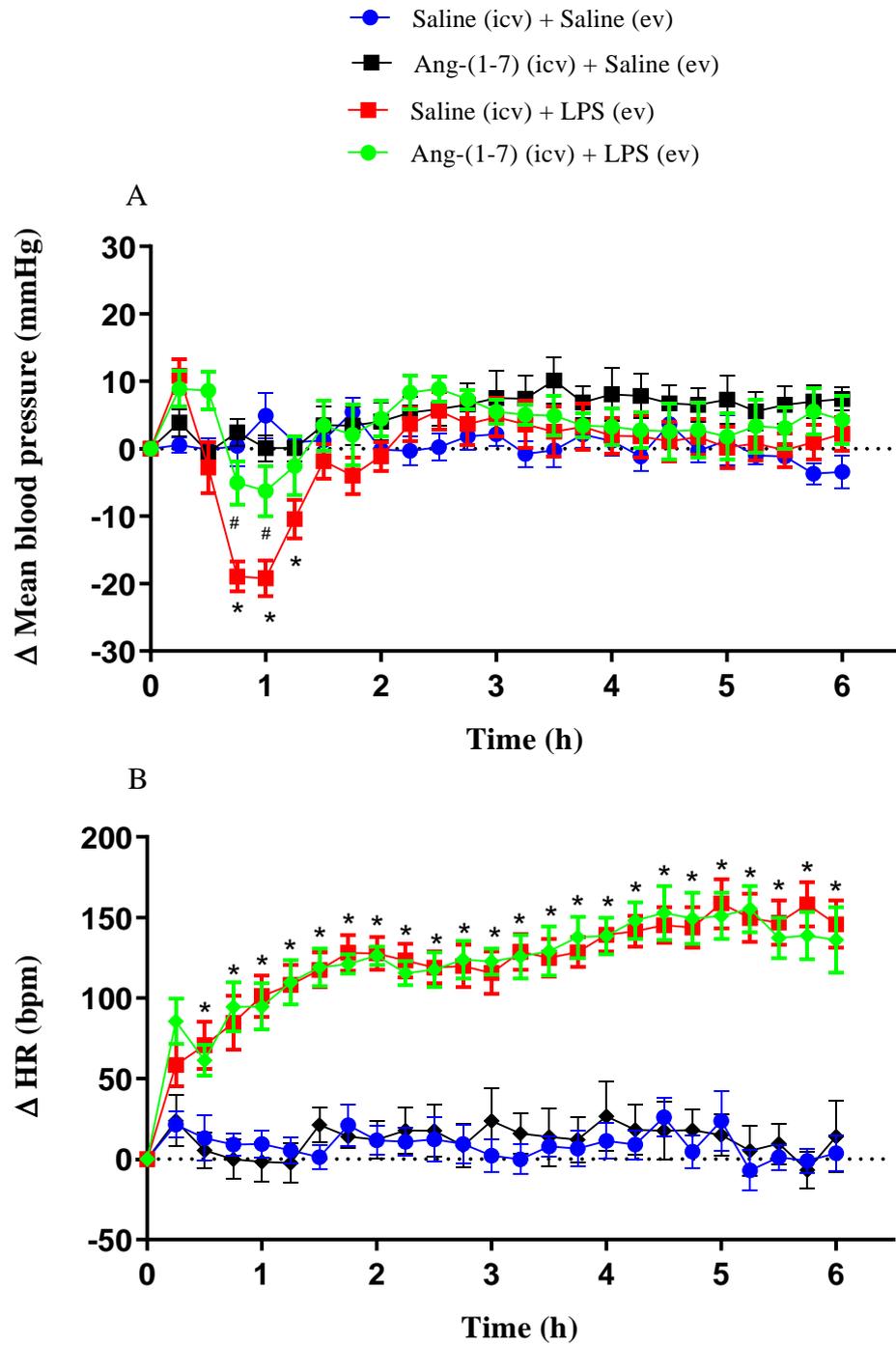
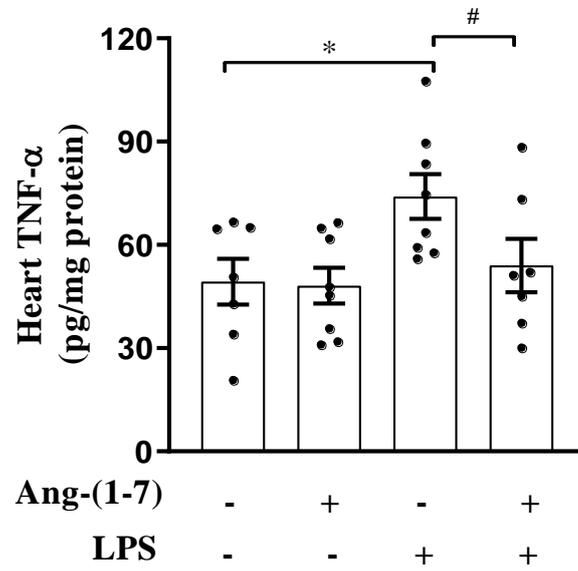


Figure 13



Tables

Table 1

Experimental groups	NE (with PVAT)		NE (without PVAT)	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
	Saline (icv) + Saline (ev)	1.46 ± 0.10	-7.17 ± 0.16	1.75 ± 0.20
Saline (icv) + LPS (ev)	0.95 ± 0.09*	-6.93 ± 0.13	1.83 ± 0.33	-7.97 ± 0.38

*p < 0,05 versus control group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Table 2

Experimental groups	NE	
	E _{max}	pD ₂
	Saline (icv) + Saline (ev)	1.28 ± 0.10
Ang-(1-7) (icv) + Saline (ev)	1.75 ± 0.18	-7.82 ± 0.20
Saline (icv) + LPS (ev)	0.95 ± 0.08*	-6.93 ± 0.13
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev)	1.40 ± 0.17 [#]	-7.05 ± 0.13

*p < 0,05 versus control group, [#]p < 0,05 versus LPS group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Table 3

Experimental groups	L-NAME	
	E _{max}	pD ₂
	Salina (icv) + LPS (ev)	1.86 ± 0.15
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev)	2.05 ± 0.27 [#]	-8.22 ± 0.13
Saline (icv) + LPS (ev) plus L-NAME	1.66 ± 0.17 [#]	-7.54 ± 0.09
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev) plus L-NAME	1.86 ± 0.24 ^{&}	-7.91 ± 0.04

[#]p < 0,05 versus LPS group without L-NAME, [&]p < 0,05 versus Ang-(1-7) + LPS without L-NAME group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Table 4

Experimental groups	TEA	
	Emax	pD2
Saline (icv) + LPS (ev)	1.44 ± 0.17	-7.52 ± 0.07
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev)	1.86 ± 0.24 [#]	-7.91 ± 0.10
Saline (icv) + LPS (ev) plus L-NAME	2.35 ± 0.31 [#]	-8.27 ± 0.14
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev) plus L-NAME	2.11 ± 0.32 ^{&}	-8.01 ± 0.15

[#]p < 0,05 versus LPS without TEA group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.

Table 5

Experimental groups	AVP	
	Emax	pD2
Saline (icv) + LPS (ev)	1.66 ± 0.17	-7.52 ± 0.07
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev)	2.31 ± 0.24 [#]	-7.91 ± 0.10
Saline (icv) + LPS (ev) plus AVP	1.86 ± 0.16	-7.42 ± 0.09
Ang-(1-7) (icv) + LPS (ev) plus AVP	2.04 ± 0.19	-7.44 ± 0.09

[#]p < 0,05 versus LPS without AVP group. ANOVA, followed *Newman-Keuls* post hoc.