

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

**GABRIEL CARDOSO SANTOS**

**Efeito central da Angiotensina-(1-7) sobre a hipoglicemia  
induzida por choque endotoxêmico em ratos**

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2023**

GABRIEL CARDOSO SANTOS

**Efeito central da Angiotensina-(1-7) sobre a hipoglicemia  
induzida por choque endotoxêmico em ratos**

Versão Original

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio

RIBEIRÃO PRETO – SP

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDOS E PESQUISAS, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Gabriel Cardoso

Efeito central da Angiotensina-(1-7) sobre a hipoglicemia induzida por choque endotoxêmico em ratos.

Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

72 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Fisiologia.

Orientadora: Cárnio, Evelin Capellari

Descritores: 1. Angiotensina-(1-7); 2. Lipopolissacarídeo; 3. Óxido nítrico; 4. Hipoglicemia; 5. Sepsis; 6. Fígado

**Título:** Efeito central da Angiotensina-(1-7) sobre a hipoglicemia induzida por choque endotoxêmico em ratos.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

**Josué 1:9**

## DEDICATÓRIA

A Deus, por permitir as realizações dos meus sonhos e por me fazer uma pessoa corajosa e resiliente.

Aos meus pais, Lúcia e Mário, minhas fontes inesgotáveis de amor, meus maiores exemplos de determinação, resiliência, coragem e humildade. Muito do que sou hoje, eu devo a vocês. Serei eternamente grato por todo incentivo e suporte.

À minha irmã, Mariana, por sempre vibrar pelas minhas conquistas e por todo apoio. Amo você.

As minhas Tias Maria José e Lourdes (*in memoriam*) por sempre me apoiarem. Vocês sempre estarão nas minhas melhores lembranças.

As minhas avós, Nair (*in memoriam*) e Núbia, pelas inúmeras orações e por todo apoio ao longo da minha caminhada.

Aos meus amigos de vida por sempre estarem presentes em todos os momentos. Tê-los ao meu lado durante esse período foi essencial. Gratidão pelas inúmeras experiências compartilhadas.

Aos meus amigos da USP pelo companheirismo e por serem a minha família em Ribeirão Preto. Sem o apoio de vocês, a caminhada seria muito mais difícil.

À minha orientadora da graduação, Prof. Dra. Érika Ramos, pela torcida, incentivo e amizade.

Aos meus familiares, por todo apoio e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio, pela oportunidade e confiança em fazer parte do seu grupo de pesquisa durante os anos de mestrado. Foi muito gratificante poder aprender sobre a Fisiologia e a vida ao lado de uma profissional tão competente, gentil e humana. Tenho máxima admiração pela pessoa e profissional que a Sra é.

Aos meus colegas/amigos de laboratório, Thaís e Hadder, por todo apoio durante realização do meu projeto e por todos os momentos compartilhados ao longo do mestrado.

A Dra. Patrícia Passaglia por todo ensinamento e colaboração ao longo da execução do mestrado.

Ao Mestre Marcelo Batalhão, pelo suporte dado durante a realização dos experimentos e pelas dosagens de nitrato.

À Claudia, Elisa e Fernando pela excelente assistência administrativa da secretaria do Departamento de Fisiologia.

Ao Prof. Dr. Luiz Guilherme Branco pela realização das *Elisas* em seu laboratório.

A Profa. Dra. Lucila Leico e as suas técnicas, Milene e Valdecir, pelo suporte oferecido para a realização de alguns dos meus experimentos e pelas dosagens de corticosterona.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Navegantes, a sua técnica, Lilian, e ao seu aluno de doutorado, MSc. Henrique Morgan, pelas dosagens de catecolaminas e realização do *Western Immunoblotting* para PEPCCK, respectivamente.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

## RESUMO

SANTOS, Gabriel Cardoso. **Efeito central da Angiotensina-(1-7) sobre a hipoglicemia induzida por choque endotoxêmico em ratos.** 2023. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O choque endotoxêmico é definido como uma síndrome infecciosa que ocasiona respostas inflamatórias exacerbadas e, anormalidades metabólicas. Dentre estas, a hipoglicemia, caracterizada por distúrbios da via da neoglicogênese, é uma das maiores causas de mortalidade em pacientes sépticos. Recentes pesquisas têm investigado a participação de vias neuroimunes eferentes simpáticas durante a inflamação sistêmica. Estas vias podem ser estimuladas mediante diversas drogas administradas centralmente, dentre estas, a ANG-(1-7). Este heptapeptídeo atua através da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias em células do sistema imune, como os macrófagos, reduzindo a sinalização da via NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$  e, conseqüentemente, a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , além de aumentar a síntese de citocina anti-inflamatória, IL-10. No entanto, não há na literatura estudos que mostram os possíveis efeitos centrais da ANG-(1-7) na estimulação da via neuroimune eferente simpática sobre a atenuação da hipoglicemia induzida LPS. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração central de ANG-(1-7) sobre a hipoglicemia induzida por choque endotoxêmico. No estudo, foram utilizados ratos *Wistar* (250-300 g) que após obterem o peso ideal, foram submetidos às cirurgias de estereotaxias para administração intracerebroventricular (*i.c.v.*) e canulação da veia jugular. O choque endotoxêmico foi induzido pela administração *e.v.* de LPS (10 mg/Kg), e o tratamento foi realizado através da administração central de ANG-(1-7) (0.3 nmol em 2 $\mu$ L). Nossos resultados demonstram que o LPS foi capaz de induzir a hipoglicemia, e que o tratamento com injeção central de ANG-(1-7) atenuou este efeito. Nossos dados também mostram que o respectivo tratamento reduziu as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NOx nos animais submetidos a sepe experimental, além diminuir as concentrações hepáticas de IL-6, e aumentar IL-10. Em adição, como consequência da redução do quadro inflamatório a nível sistêmico e



hepático, o tratamento com ANG-(1-7) foi capaz de aumentar a expressão enzimática de PEPCK. Em síntese, os dados sugerem que o tratamento central com ANG-(1-7) atenua a hipoglicemia induzida pelo choque endotoxêmico e esse efeito pode ser devido a seu efeito anti-inflamatório, levando a uma restauração da neoglicogênese hepática.

**Palavras-chave:** Angiotensina-(1-7); Lipopolissacarídeo; Óxido nítrico; Hipoglicemia; Sepsis; Fígado.

## ABSTRACT

SANTOS, Gabriel Cardoso. **Effect of central angiotensin-(1-7) on endotoxemic shock-induced hypoglycemia in rats**. 2023. 72 p. Dissertation (Master of Science, concentration area: Physiology) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Endotoxemic shock is defined as an infectious syndrome that causes exacerbated inflammatory responses and metabolic abnormalities. Among these, hypoglycemia, characterized by disorders of the gluconeogenesis pathway, is one of the major causes of mortality in septic patients. Recent research has investigated the participation of sympathetic efferent neuroimmune pathways during systemic inflammation. These pathways can be stimulated by several drugs administered centrally, among them, ANG-(1-7). This heptapeptide acts by inhibiting the synthesis of pro-inflammatory cytokines in cells of the immune system, such as macrophages, reducing the signaling of the NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$  pathway and, consequently, the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , in addition to increasing anti-inflammatory cytokine synthesis, IL-10. However, there are no studies in the literature that show the possible central effects of ANG-(1-7) in the stimulation of the sympathetic efferent neuroimmune pathway on the attenuation of LPS-induced hypoglycemia. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of central administration of ANG-(1-7) on hypoglycemia induced by endotoxemic shock. In the study, Wistar rats (250-300 g) were used, which after reaching the ideal weight, were submitted to stereotactic surgeries for intracerebroventricular (i.c.v.) administration and cannulation of the jugular vein. Endotoxemic shock was induced by i.v. of LPS (10 mg/Kg), and the treatment was carried out through the central administration of ANG-(1-7) (0.3 nmol in 2 $\mu$ L). Our results demonstrate that LPS was able to induce hypoglycemia, and that treatment with central injection of ANG-(1-7) attenuated this effect. Our data also show that the respective treatment reduced the plasmatic concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and NOx in the animals submitted to experimental sepsis, in addition to decreasing the hepatic concentrations of IL-6 and increasing IL-10. In addition, as a consequence of the reduction of the inflammatory picture at the systemic and hepatic levels, the

treatment with ANG-(1-7) was able to increase the enzymatic expression of PEPCK. In summary the data suggest that central treatment with ANG-(1-7) attenuates endotoxemic shock induced hypoglycemia, probably due to the anti-inflammatory, leading to a restoration of hepatic gluconeogenesis.

**Keywords:** Angiotensin-(1-7); Lipopolysaccharide; Nitric oxide; Hypoglycemia; Sepsis; Liver.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Formação do Sistema Renina-Angiotensina.

**Figura 2.** Via de formação da ANG-(1-7) a partir da ANG II.

**Figura 3.** Via de sinalização intracelular da ANG-(1-7).

**Figura 4.** Hipótese do trabalho.

**Figura 5.** Representação em esquema do respectivo protocolo experimental.

**Figura 6.** Representação em esquema do respectivo protocolo experimental.

**Figura 7.** Avaliação dos níveis glicêmicos de ratos sépticos tratados com salina ou ANG-(1-7).

**Figura 8.** Valores médios dos níveis glicêmicos de ratos sépticos tratados com salina ou ANG-(1-7).

**Figura 9.** Expressão enzimática de PEPCK.

**Figura 10.** Concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias na 3ª hora de choque endotoxêmico.

**Figura 11.** Concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias na 6ª hora de choque endotoxêmico.

**Figura 12.** Concentração hepática de citocinas pró-inflamatórias na 3ª hora de choque endotoxêmico.

**Figura 13.** Concentração hepática de citocinas pró-inflamatórias na 6ª hora de choque endotoxêmico.

**Figura 14.** Concentração sistêmica de IL-10, citocina anti-inflamatória, na 3ª e 6ª hora de choque endotoxêmico.

**Figura 15.** Concentração hepática de IL-10, citocina anti-inflamatória, na 3ª e 6ª hora de choque endotoxêmico.

**Figura 16.** Concentração plasmática de NOx na 3ª e 6ª hora de choque endotoxêmico.

**Figura 17.** Proposta do mecanismo de ação do efeito protetor da ANG-(1-7) central em relação aos efeitos deletérios causados por LPS.

## LISTA DE SIGLAS

- AMPK** – Proteína Quinase Ativada por AMP
- ANG I** – Angiotensina I
- ANG II** – Angiotensina II
- ANG-(1-7)** – Angiotensina-(1-7)
- AP-1** – Proteína Ativadora AP-1
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- BH4** – Tetra-hidrobiopterina
- COX-2** – Ciclooxigenase-2
- E. V.** – Via de administração endovenoso
- ECA** – Enzima Conversora de Angiotensina
- ECA2** – Enzima Conversora de Angiotensina tipo II
- e-NOS** – Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- FOXO1** – Forkhead box protein O1
- G6Pase** – Enzima glicose-6-fosfatase
- GLUT-1** – Transportador de Glicose tipo 1
- HPA** – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
- I. C. V** – Via de administração intracerebroventricular
- I. P.** – Via de administração intraperitoneal
- IL-1** – Interleucina-1
- IL-10** – Interleucina-10
- IL-1 $\beta$**  – Interleucina-1 $\beta$
- IL-23** – Interleucina-23

**IL-6** – Interleucina-6

**i-NOS** – Óxido Nítrico Sintase Induzível

**JNK** – c-Jun N-terminal cinase

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**MAPKs** – Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos

**MCP-1** – Quimioatraente de Monócito Tipo 1

**NADPH** – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

**NF- $\kappa$  $\beta$**  – Factor Nuclear kappa  $\beta$

**n-NOS** – Óxido Nítrico Sintase Neuronal

**NOS** – Óxido Nítrico Sintase

**NO<sub>x</sub>** – Óxido Nítrico

**PCP** – Enzima prolilcarboxipeptidase

**PCR** – Proteína c-reativa

**PEP** – Enzima prolilendopeptidase

**PEPCK** – Enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase

**Proteína-G** – Proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SNS** – Sistema Nervoso Simpático

**SOCS3** – Supressor da Sinalização de Citocinas 3

**SRA** – Sistema Renina-Angiotensina

**STAT-3** – Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição Tipo 3

**TGF- $\beta$**  – Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$

**TLR4** – Toll Like Receptor 4

**TNFR1** – Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral Alfa



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1 Modelo experimental de inflamação sistêmica: choque endotoxêmico .....	20
1.1.2. O Sistema Renina-Angiotensina durante a inflamação sistêmica.....	22
1.1.3. Formação da Angiotensina-(1-7) e suas ações.....	24
1.1.4. Alterações metabólicas induzidas por LPS: hipoglicemia.....	26
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1. Objetivo geral.....	30
2.1.2. Objetivos específicos .....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1. Animais .....	32
3.1.2. Drogas .....	32
3.2 Desenho Experimental .....	32
3.2.1. Tratamento .....	32
3.2.2. Grupos experimentais .....	32
3.3. Cirurgia .....	33
3.3.1. Cirurgia de estereotaxia .....	33
3.3.2. Canulação da veia jugular externa direita .....	34
3.4 Técnicas .....	34
3.4.1. Western Immunoblotting para PEPCK/ $\beta$ -actina.....	34
3.4.2. Dosagem de Nitrato/Nitrito (NO <sub>x</sub> ) .....	35
3.4.3. Dosagem de citocinas .....	36
3.4.4. Mensuração da glicemia .....	36
3.4.5. Protocolos Experimentais .....	36
3.4.5.1. Protocolo experimental I –.....	36

3.4.5.2. Protocolo experimental II – .....	37
3.5. Análise estatística.....	38
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
4.1. Avaliação dos níveis glicêmicos entre os intervalos de 1 a 6 horas. ....	40
4.1.2. Níveis glicêmicos avaliados nos intervalos de 1 a 6 horas. ....	41
4.1.3. Expressão enzimática de PEPCK durante hipoglicemia induzida por choque endotoxêmico.....	42
4.1.4. Efeito do tratamento com a administração central de ANG-(1-7) na inflamação sistêmica.....	44
4.1.5. Participação do tratamento com a administração central de ANG-(1-7) na concentração hepática de citocinas pró-inflamatórias. ....	46
4.1.6. Ação central da ANG-(1-7) na concentração de IL-10 plasmática, importante citocina anti-inflamatória. ....	49
4.1.7. Papel central da ANG-(1-7) na concentração de IL-10 hepática durante o choque endotoxêmico. ....	50
4.1.8. Participação central da ANG-(1-7) na concentração plasmática de NOx durante o choque endotoxêmico. ....	51
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Modelo experimental de inflamação sistêmica: choque endotoxêmico

A sepse é uma disfunção orgânica ocasionada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, sendo acompanhada por uma resposta inflamatória sistêmica, falência de órgãos e supressão imunológica (DELANO; WARD, 2016; DELLINGER et al., 2004; LEVY et al., 2003). Esta condição clínica é um problema de saúde e está entre as principais causas de morbidade e mortalidade (MARTIN et al., 2003; ANGUS et al., 2001).

A progressão da sepse pode levar ao choque séptico, definido como um subconjunto da inflamação sistêmica, onde anormalidades metabólicas, circulatórias e celulares estão presentes, acarretando em diversas disfunções de caráter persistentes, como a febre, hipotermia, hipotensão e hipoglicemia (JADHAV; SADAKA, 2019; SEYMOUR et al., 2016; SINGER et al., 2016, CATON et al., 2009). Apesar dos avanços conhecidos no tratamento ao choque séptico, a sepse está associada a alta mortalidade, com cerca de 40% dos óbitos (JADHAV; SADAKA, 2019; SINGER et al., 2016).

Dentre os modelos animais utilizados para reproduzir o desenvolvimento da sepse, podemos destacar a administração de componentes microbianos exógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente na membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas (DOI et al., 2009). O LPS é liberado durante a destruição da bactéria pelas células imunes, como os macrófagos, e uma vez na corrente sanguínea, desencadeia uma resposta inflamatória severa, ao se ligar as vias de sinalização do receptor Toll (TLR), como por exemplo, o TLR4 (CHOWDHURY; SACKS; SHEERIN, 2006; EHRENTAUT et al., 2007).

Na indução da resposta inflamatória, o LPS liga-se ao receptor TLR4 transmitindo fatores de transcrição, como o factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$ B). A ativação imune leva a produção de citocinas pró-inflamatórias, em particular o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ) que recrutam componentes inatos e adaptativos da inflamação para os locais da lesão (SALOMAO et al., 2012). Esse receptor está presente em células de linhagem mieloide e algumas células não imunes, como células epiteliais intestinais e células endoteliais,

participando ativamente da liberação de peptídeos vasodilatadores em resposta a administração de LPS (EHRENTRAUT *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2009).

Diversas disfunções que ocorrem durante a inflamação sistêmica são ocasionadas por importantes mediadores presentes no desenvolvimento clínico e experimental da sepse. Descrito na literatura como um importante mediador no desenvolvimento clínico da sepse, o Óxido Nítrico (NOx) é sintetizado frente ao estímulo infeccioso por diferentes células e tecidos. A síntese de NOx independente de cálcio é induzida por interações de endotoxinas de membranas bacterianas com células endoteliais vasculares, ocasionando elevação nas concentrações de NOx. (SNYDER, 1992; ZARDI *et al.*, 2007).

No epitélio vascular, o NOx é sintetizado por ações das isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), as quais convertem a L-arginina e a molécula de oxigênio em L-citrulina e NO, utilizando como co-fatores a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e a NADPH (nicotinamida-adeninad nucleotídeo-fosfato-hidrogênio) (BRIONES; TOUYZ, 2010). A NOS possui três isoformas diferentes, classificadas por genes distintos: O NOS neuronal (n-NOS) é uma forma constitutiva presente no tecido nervoso; a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; BOGDAN, 2015; FÖRSTERMANN *et al.*, 1994).

Além do NOx, as citocinas pró-inflamatórias são importantes agentes nas formações de anormalidades metabólicas. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- $\alpha$  é um dos mediadores inflamatórios mais citados pela literatura atual.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina inflamatória produzida principalmente pela interação do LPS com células imunes, como os macrófagos e mastócitos ativados (BEUTLER *et al.*, 1986). O TNF- $\alpha$  e a interleucina-6 (IL-6) são as principais citocinas pró-inflamatórias. Resultados de SONG *et al.*, (2012), mostram que durante a endotoxemia, o TNF- $\alpha$  atua como o principal ativador da cascata inflamatória, sendo a causa de muitos sintomas observados durante o processo de inflamação sistêmica, dentre eles a disseminação da coagulação vascular, hipotensão e falência de órgãos, sendo as suas

principais ações biológicas resultantes da sua interação com o seu receptor, o TNFR1 (BLACK *et al.*, 1997).

Esta citocina exerce seus efeitos ativando um número de proteínas secundárias, como a Proteína-G, os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1, e as proteínas quinases, que estimulam uma variedade de respostas dentro da célula, como a ativação da transcrição do gene, e a produção de oxigênio reativo ou radicais de nitrogênio, como por exemplo, o NO<sub>x</sub> (IDRISS; NAISMITH, 2000).

A interação do TNF- $\alpha$  com o seu receptor TNFR1, gera a ativação de um desencadeamento de vias intracelulares, tais como a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs – *Mitogen-Activated Protein Kinases*). A ativação destas vias também resulta na expressão de enzimas induzíveis, como o óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (ZHANG *et al.*, 2009). Além de produzir NO<sub>x</sub>, a ativação do TNFR1 estimula a formação de espécies reativas do oxigênio (ERO) via ativação da NAD(P)H oxidase, uma enzima presente em condições fisiopatológicas (BRIONES; TOUYZ, 2010).

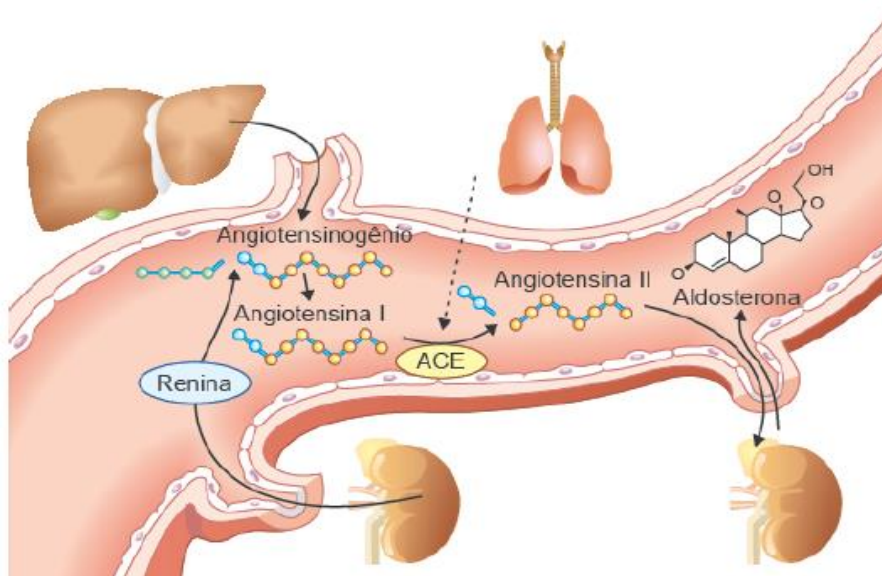
Deste modo, a interação entre o LPS e o seu receptor TLR4 é responsável por ocasionar uma série de respostas inflamatórias, como a produção de citocinas pró-inflamatórias e de peptídeos, como a TNF- $\alpha$  e a IL-6, NO e COX-2, respectivamente, que ao longo do tempo irão desencadear diversas alterações sistêmicas, como por exemplo, as desordens metabólicas que ocorrem durante a endotoxemia.

### *1.1.2. O Sistema Renina-Angiotensina durante a inflamação sistêmica*

Estudos atuais tem demonstrado que as desordens presentes na sepse estão relacionadas a mecanismos do controle homeostático da pressão arterial sistêmica, dentre eles, o sistema renina-angiotensina (SRA) (ANTONUCCI *et al.*, 2014; JADHAV; SADAKA, 2019).

Para a formação deste sistema que regula a homeostase, o angiotensinogênio, produzido pelo fígado, e em menor quantidade pelo tecido adiposo, é convertido em angiotensina I [Ang-(1-10)] (ANG I) no plasma sanguíneo, através da enzima renina, liberada pelas células justaglomerulares dos rins. Uma vez formado, a ANG I é hidrolisada em Angiotensina II (ANG II) por ação da enzima conversora de

angiotensina (ECA), formada na microcirculação pulmonar e no endotélio da circulação sistêmica (figura 1) (JADHAV; SADAKA, 2019).



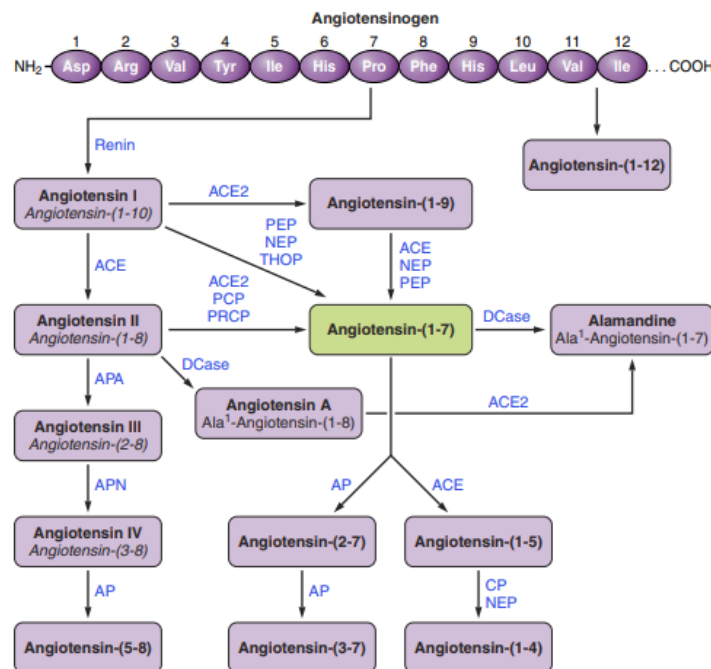
**Figura 1.** Formação do Sistema Renina-Angiotensina. ECA: Enzima Conversora de Angiotensina. (Figura retirada de Fisiologia/Margarida de Mello Aires, 5ª ed, 2018; Adaptação de Weber, 2001).

Durante o choque séptico, a ANG II pode atuar de forma local e sistêmica, exercendo funções diferentes em vários órgãos (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). Corrêa; Takala e Jakob (2015) demonstraram a importante contribuição do SRA durante a sepse. Estes autores relataram que durante inflamação sistêmica, a atividade plasmática da renina, ANG I e ANG II estão aumentadas. Assim, em altas concentrações plasmáticas de ANG II, alterações sistêmicas são instaladas, uma vez que a ativação do SRA estimula o estresse oxidativo e a disfunção endotelial (LUND *et al.*, 2007).

A ANG II, quando liberada em grandes quantidades, é responsável por regular positivamente a expressão da proteína quimioatraente de monócito tipo 1 (MCP-1), TNF- $\alpha$ , IL-6 e interleucina-8 (IL-8), que atuam como quimioatrativos e ativadores de neutrófilos (NOBUHIKO *et al.*, 2004). Adicionalmente, a Ang II também é responsável pelo aumento de marcadores da inflamação aguda, como a proteína C-reativa (PCR), ERO e NF- $\kappa$ B (HAN *et al.*, 2010).

### 1.1.3. Formação da Angiotensina-(1-7) e suas ações

Embora a ANG II possua ações pró-inflamatórias e de aumento do estresse oxidativo, quando formada, esta pode ser então convertida em angiotensina-(1-7) (ANG-1-7) pela enzima conversora de angiotensina II (ECA2), análoga à enzima conversora de angiotensina (ECA), e em menor quantidade por meio das enzimas PCP (prolilcarboxipeptidase) e PEP (prolilendopeptidase) (figura 2) (SANTOS *et al.*, 2018). Este peptídeo, descoberto cerca de três décadas atrás, atua no receptor Mas, que está acoplado a proteína G, e age por meio da contrarregulação da sinalização de ANG II, diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio ERO e a ativação de NAD(P)H oxidase por ANG II (SAMPAIO *et al.*, 2007). Além desses efeitos, a ANG-(1-7) atua inibindo MAPKs, mediadores centrais que agem na proliferação celular, fibrose e remodelação (ZHU *et al.*, 2002).



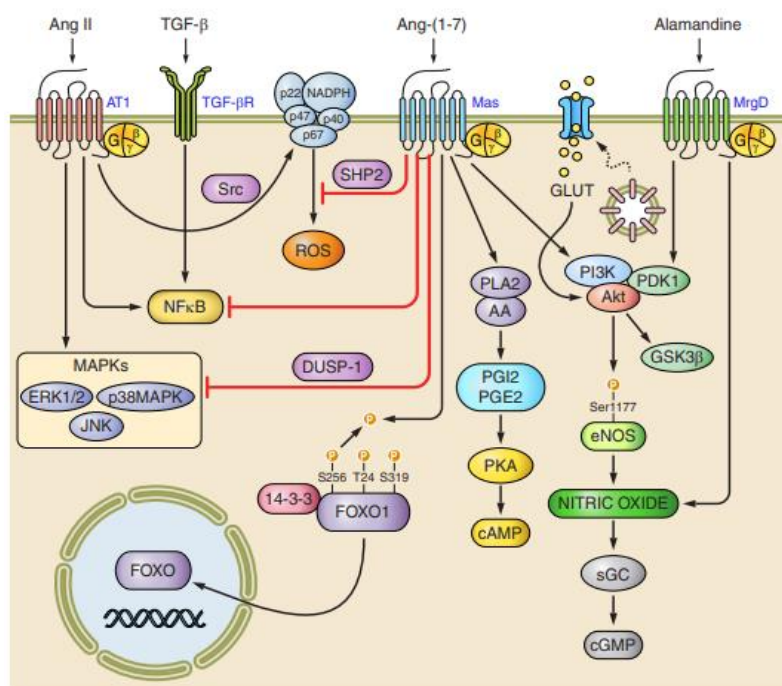
**Figura 2.** Via de formação da ANG-(1-7) a partir da ANG II. **ECA:** Enzima conversora de angiotensina; **PCP:** Prolilcarboxipeptidase; **PEP:** Prolilendopeptidase; **ANG:** Angiotensina; **AT1:** Receptor de angiotensina tipo 1; **AT2:** Receptor de angiotensina tipo 2. (Figura retirada de SANTOS *et al.*, 2018).

De acordo com Souza; Costa-Neto (2012), a ANG-(1-7) é responsável por inibir a formação de citocinas pró-inflamatórias derivadas da administração de LPS. Novas análises têm demonstrado que a administração central deste heptapeptídeo pode regular



negativamente a inflamação sistêmica induzida por LPS, reduzindo a síntese de NOx e TNF- $\alpha$  pelo baço e fígado. Este mecanismo de ação, descrito recentemente, se dá pela ativação do eixo ANG-(1-7)/receptor Mas central, através da ativação da via simpática e norepinefrina (PASSAGLIA *et al.*, 2020). Assim, importantes interações neuroimunes, onde há ativação de diferentes vias neurais, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o eixo simpático eferente, parecem atuar de forma significativa no controle da inflamação (PAVLOV; CHAVAN; TRACEY, 2018).

Quanto aos seus demais efeitos anti-inflamatórios, segundo El-Hashim *et al.*, (2012), a ANG-(1-7) proporciona a inibição do aumento de citocinas induzida pela ovalbumina, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos. Alguns outros mecanismos das ações anti-inflamatórias da ANG-(1-7) são relatados pela literatura, dentre estes, a redução da sinalização do NF- $\kappa$ B e do fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$ , importantes fatores de transcrição para a síntese e liberação das citocinas. Assim, por meio da inibição da via NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ , a ANG-(1-7) medeia a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, reduzindo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, e aumentando IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória (figura 3) (SANTOS, *et al.*, 2018; EL-HASHIM *et al.*, 2012; GIANI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015; MENG *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Via de sinalização intracelular da ANG-(1-7). (Figura retirada de SANTOS *et al.*, 2018).

#### 1.1.4. Alterações metabólicas induzidas por LPS: hipoglicemia

A manutenção da homeostase dos níveis glicêmicos é de extrema importância para a sobrevivência. Em situações como ocorre durante o jejum, onde os níveis glicêmicos tendem a cair, a produção de glicose se dá através do fígado, principal responsável, onde ocorre a glicogenólise hepática e a gliconeogênese, sendo esta última descrita como a produção de glicose por diferentes substratos, como aminoácidos, glicerol e lactato, fornecendo, deste modo, glicose para tecidos extra-hepáticos. Para isso, diversos hormônios participam do controle destas vias, dentre estes o glucagon, corticosterona, catecolaminas e a insulina (SANTOS *et al.*, 2013; SALTIEL, 2001).

Em períodos de privação alimentar, hormônios como o glucagon e corticosterona atuam aumentando a expressão de diversas enzimas de velocidade na gliconeogênese, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a frutose-1,6-bifosfatase, a glicose-6-fosfatase (G6Pase), entre outras. No entanto, elevados níveis de insulina circulantes são responsáveis por inibir a sua expressão (PILKIS; GRANNER, 1992). Adicionalmente, esses hormônios são responsáveis por regular a ativação de múltiplos fatores de transcrição, que agem favorecendo a expressão gênica da gliconeogênese no fígado, como FOXO1, JNK, AMPK e a STAT-3 (INOUE *et al.*, 2004; KOO *et al.*, 2005).

Entretanto, várias condições podem levar ao desbalanço da homeostase dos níveis glicêmicos e, como já descrito anteriormente, a administração de LPS é um dos fatores responsáveis por ocasionar diversas alterações, dentre estas, distúrbios metabólicos, como a hipoglicemia, caracterizada por reduções dos níveis glicêmicos abaixo de  $\leq 70$  mg/dL. Anormalidades glicêmicas são observadas frequentemente em quadros clínicos de inflamação sistêmica. Dados recentes têm demonstrado que o estresse agudo proporcionado pela sepse é responsável por resultar em hiperglicemia, e que condições como a hipoglicemia estão atreladas a respostas patológicas, com possíveis reduções dos níveis de glicose no cérebro (neuroglicopenia), resultando em altas taxas de mortalidade. (DUNGAN; BRAITHWAITE; PREISER, 2009; PLUMMER *et al.*, 2014; FINFER *et al.*, 2012; HERMANIDES *et al.*, 2010; KRINSLEY; GROVER, 2007).

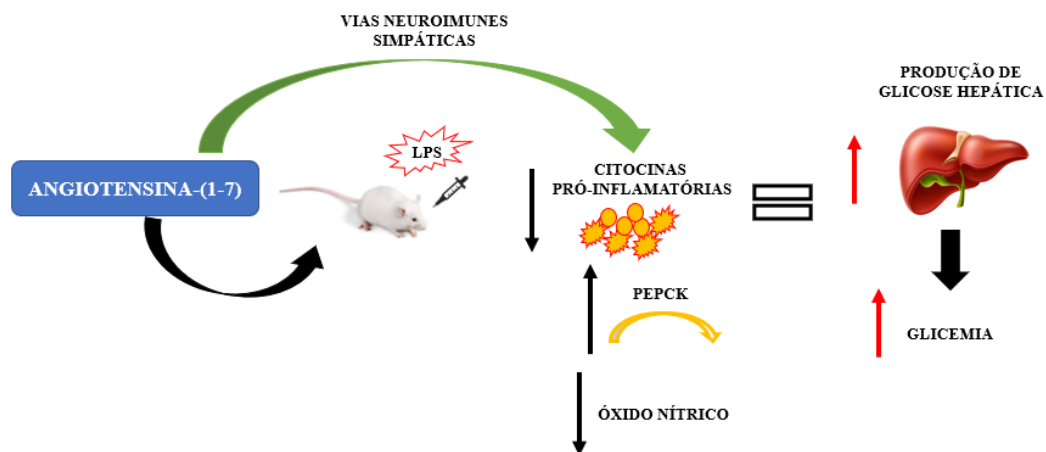
A hipoglicemia induzida por LPS é desencadeada por uma série de modificações metabólicas resultantes de ações promovidas por citocinas pró-inflamatórias como

TNF- $\alpha$  e IL-6, e por estresse oxidativo, ocasionando redução da via da neoglicogênese por meio da diminuição da expressão de enzimas importantes para esta via, como a PEPCK e da G6Pase (YANAY *et al.*, 2015; CATON *et al.*, 2009). A administração de LPS também promove alterações em diferentes fatores de transcrição da gliconeogênese, como descrito por Santos *et al.*, 2013, que observou aumento na fosforilação de STAT-3, FOXO1 e JNK em camundongos tratados com LPS.

Além dos fatores citados acima, durante a fase de hiperinflamação presente na sepse, ocorre o consumo de grandes quantidades de energia na forma de Trifosfato de adenosina (ATP) através de células do sistema imune, como macrófagos, monócitos e células dendríticas, que utilizam o ATP, derivado da glicólise, como fonte de energia durante o estresse extremo, resultando no maior consumo de glicose. Então, o aumento no consumo de glicose durante a hiperinflamação é necessário para a ação de células do sistema imune inato, que ao serem recrutadas estimulam o alto consumo de energia, mecanismos efetores da imunidade e a rápida regeneração celular (WARBURG; GAWEHN; GEISSLER, 1958; VACHHARAJANI; MCCALL, 2019).

A hipoglicemia por inflamação sistêmica também é resultado da inibição da resposta dos corticosteroides ao estresse e da redução da ingestão alimentar. Esta queda dos níveis glicêmicos também está relacionada com a elevação da captação de glicose em tecidos como diafragma, baço, fígado e pulmão, efeito descrito como o aumento da captação de glicose por macrófagos, havendo uma facilitação no aumento da expressão de GLUT-1 mediada por TNF- $\alpha$  (LANG *et al.*, 1993; GAMELLI *et al.*, 1996). Por fim, o comprometimento na resposta e exaustão do Sistema Nervoso Simpático (SNS), a indução a hipotensão e a produção exacerbada de NOx também são fatores que ocasionam hipoglicemia (FINFER *et al.*, 2012).

Considerando os efeitos ocasionados por LPS e as ações centrais da administração da ANG-(1-7), torna-se oportuno avaliar a atuação da ANG-(1-7) no choque séptico e na hipoglicemia induzida por endotoxemia em ratos. Em síntese, a hipótese deste projeto é que a administração de ANG-(1-7) central irá atenuar a hipoglicemia induzida por LPS através da ativação central de vias neuroimunes simpáticas, reduzindo citocinas pró-inflamatórias e NOx, aumentando a expressão de PEPCK bem como a produção hepática de glicose (figura 4).



**Figura 4. Hipótese do respectivo trabalho** – A administração de ANG-(1-7) central irá atenuar a hipoglicemia induzida por LPS através da ativação central de vias neuroimunes simpáticas, reduzindo citocinas pró-inflamatórias e NOx, aumentando a expressão de PEPCK bem como a produção hepática de glicose.

***OBJETIVOS***

## **2. OBJETIVOS**

### *2.1. Objetivo geral*

Avaliar os efeitos da administração central de ANG-(1-7) sobre a hipoglicemia induzida por choque endotoxêmico em ratos.

#### *2.1.2. Objetivos específicos*

Analisar a ação central da ANG-(1-7) sobre as citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e óxido nítrico durante o choque endotoxêmico.

Investigar os efeitos centrais da ANG-(1-7) sobre as concentrações plasmáticas de glicose durante o choque endotoxêmico.

Avaliar os efeitos da administração central da ANG-(1-7) sobre a expressão enzimática de PEPCCK durante choque endotoxêmico.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar Hannover* adultos, com peso médio entre 250-300 g, provenientes do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas, em ambiente com temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), sob ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à ração comercial balanceada. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-USP com o respectivo N° **Processo CEUA: 21.1.70.22.2.**

#### 3.1.2. Drogas

As drogas utilizadas no projeto foram o LPS (*Escherichia coli* sorotipo 0111:B4) e ANG-(1-7) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ambas as drogas foram diluídas em solução salina 0,9% estéril.

#### 3.2 Desenho Experimental

##### 3.2.1. Tratamento

Os animais receberam o LPS através da via endovenosa, pela veia jugular externa direita – dose de LPS (10 mg/Kg) e concentração de 0, 25 ml/kg (Lo *et al.*, 2004). A administração de ANG-(1-7) ou salina ocorreu através da introdução de uma cânula guia de aço inoxidável (0,4 mm) no ventrículo lateral direito. A dose de ANG-(1-7) ou salina (0.3 nmol em 2  $\mu\text{L}$ ) foi escolhida com base nos resultados obtidos por (MAHON *et al.*, 1995; OLIVEIRA; CAMPAGNOLE-SANTOS; SANTOS, 2013).

##### 3.2.2. Grupos experimentais

Os animais foram submetidos a cirurgia de canulação da veia jugular externa direita, para a administração de droga por via endovenosa (*e.v.*), e a cirurgia de estereotaxia para a fixação da cânula guia de aço inoxidável no ventrículo lateral direito,



para aplicação de droga via intracerebroventricular (i.c.v.). Após os períodos de recuperação, os animais foram divididos em quatro grupos:

3.2.2.1. *Grupo salina + salina*: Inicialmente, os animais receberam solução salina (0,9% - 2  $\mu$ L, i.c.v.) e, após trinta minutos, o respectivo grupo recebeu 0,25 ml de salina (0,9%, e.v.) (n= 6 – 7 animais).

3.2.2.2. *Grupo ANG-(1-7) + salina*: Os animais receberam 0.3 nmol em 2  $\mu$ L de ANG-(1-7) (i.c.v.). Trinta minutos após, foi aplicada solução de 0,25 ml de salina (0,9%, e.v.) (n= 6 – 7 animais).

3.2.2.3. *Grupo salina + LPS*: Os animais receberam solução salina (0,9% - 2 $\mu$ L, i.c.v.). Logo, trinta minutos depois, foi aplicada solução 0,25 ml de LPS na concentração de 10 mg/Kg (e.v.) (n= 6 – 7 animais).

3.2.2.4. *Grupo ANG-(1-7) + LPS*: Os animais receberam 0.3 nmol em 2  $\mu$ L de ANG-(1-7) (i.c.v.). Trinta minutos após, foi aplicada solução 0,25 ml de LPS na concentração de 10 mg/Kg (e.v.) (n= 6 – 7 animais).

### 3.3. Cirurgia

#### 3.3.1. Cirurgia de estereotaxia

Sete dias antes do experimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilasina (90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p., diluída em solução salina isotônica 0,9%) (Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) e então submetidos a fixação da estrutura estereotáxica (i.c.v.). Uma cânula guia de aço inoxidável (0,4 mm) foi introduzida no ventrículo lateral direito (coordenadas: A:-1,6 mm, L: 1 mm, D: 3,6 mm do bregma) (Paxinos e Watson, 2007). O deslocamento do menisco em um manômetro de água garantiu a posição correta da cânula no ventrículo lateral. Assim, cânula foi fixada ao crânio com parafusos de aço inoxidável e acrílico dental (cimento). Após a cirurgia, os animais permaneceram em recuperação em caixas plásticas individuais (738 cm<sup>2</sup> e tampa aramada) acondicionadas em estante ventilada (25  $\pm$  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 externa direita*

Um dia antes do início do experimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilasina (90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p., diluída em solução salina isotônica 0,9%) para a canulação da veia jugular externa direita. 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 foi introduzida na veia e presa por linhas de sutura. A porção livre da cânula foi então transpassada por baixo da pele, e exteriorizada na superfície do pescoço. Todas as incisões foram fechadas com linha de sutura estéril.

## 3.4 *Técnicas*

### 3.4.1. *Western Immunoblotting para PEPCK/ $\beta$ -actina*

As amostras de fígados foram homogeneizadas (TissueLyzerII; 30Hz; 2 min) em 6 volumes de tampão TRIS-HCL (50mM; pH7,4; 4°C) contendo 150 mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, inibidores de proteases (1 mM PMSF, 5 $\mu$ g/ml de aprotinina e 1  $\mu$ g/ml de leupeptina), inibidores de fosfatases (10 mM ortovanadato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e 100 mM fluoreto de sódio) e inibidores de deacetilases (1mM nicotinamida e 400 nM tricostatina A).

Logo após, o homogenato foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer - 80°C. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry (WALKER; WATERBORG; MATTHEWS, 2003). Alíquotas contendo 10-100  $\mu$ g de proteína foram adicionadas tampão de Laemmli (SDS 4%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, azul de bromofenol 2%, pH 6,8), aquecidas a 70°C por 10 minutos sob agitação e então submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE em sistema de mini gel vertical (BioRad) com tampão contendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,4), glicina 115 mM e SDS 0,1%, sob 100 Volts por 2 horas.

Assim, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose pelo sistema TransBlot SD Cell (BioRad) com tampão contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 10% e metanol 0,2 M, pH 7,4, sob 400 mA por 30 minutos, e então a membrana de nitrocelulose foi incubada em solução de TBS-T (Tris-HCL 0,02

M, NaCl 0,16 M, Tween 20 0,1%, pH 7,4) com leite desnatado 10% por 1 hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada em solução TBS-T (acrescida de albumina sérica bovina 2,5% e NaN<sub>3</sub> 0,01%) contendo anticorpos primários para as proteínas de interesse no sistema SNAP i.d. 2.0 (Milipore) por 15 minutos ou overnight a 4°C, sendo este o anticorpo para PEPCCK com código [sc-32879](#) e diluição 1/10000, e o anticorpo para  $\beta$ -actina com código [sc-81178](#) na diluição de 1/5000. A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno do conteúdo de proteínas totais. As formas fosforiladas foram corrigidas pelas formas totais das proteínas ou pela  $\beta$ -actina.

Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas logo após em solução de TBS-T com anticorpo secundário com peroxidase por 15 minutos no sistema SNAP i.d. 2.0 ou 1 hora na temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas em TBS-T e expostas ao sistema de detecção de imagem ChemiDoc XRS+ (BioRad) após a adição do reagente de quimioluminescência (Tris-HCl 1 M, pH 8,5, luminol 250 mM, ácido cumárico 90 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01%). A análise das bandas (densitometria) foi realizada utilizando o software ImageJ e os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (100%).

#### *3.4.2. Dosagem de Nitrato/Nitrito (NO<sub>x</sub>)*

Após coletado o plasma, 50  $\mu$ L do sobrenadante foi separado e desproteinizado com 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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 NaI em ácido acético (para determinação de nitrito). O resultado da concentração sérica do NO<sub>x</sub> foi expresso em  $\mu$ M/mL.

### 3.4.3. Dosagem de citocinas

O plasma foi diluído com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) e o tecido hepático homogeneizado em PBS contendo inibidores de protease, seguido de centrifugação (10.000 rpm, 4 ° C, 10 min). Os níveis de interleucina (IL) -1 $\beta$  (catálogo # RLB00), IL-6 (catálogo # R6000B) e IL-10 (catálogo # R1000) foram quantificados por ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) usando kits comerciais da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) de acordo com o manual do usuário. A dosagem do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) deu-se através do kit ELISA da Biolegend (catálogo 438206) (San Diego, CA, EUA) de acordo com o manual do usuário. Os resultados foram então expressos em pg/mL e pg/mg de proteína.

### 3.4.4. Mensuração da glicemia

Amostras de sangue (3.5  $\mu$ L) foram coletadas por meio de um pequeno corte na ponta da cauda do animal. A análise da glicemia ocorreu por meio do glicosímetro Accu-Chek Guide (Roche Diabetes Care), seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados da glicose foram expressos em mg/dL.

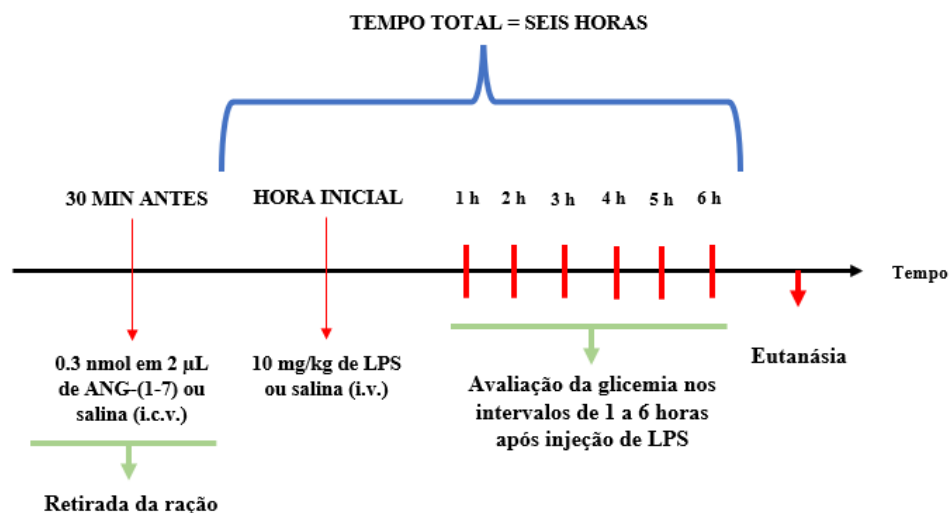
### 3.4.5. Protocolos Experimentais

#### 3.4.5.1. Protocolo experimental I –

Sete dias antes do tratamento com salina ou ANG-(1-7), os animais foram submetidos a cirurgia de estereotaxia. Posteriormente, um dia antes do tratamento, os animais passaram pela cirurgia de canulação da veia jugular externa, e no dia seguinte, trinta minutos antes da realização do experimento, tiveram as suas rações retiradas, para a realização do jejum (YANAY *et al.*, 2015). Trinta minutos após a administração de salina ou ANG-(1-7) (0.3 nmol em 2  $\mu$ L) (i.c.v.), foi aplicada salina ou LPS (10 mg/Kg) (e.v.) (figura 5).

Ao decorrer do tratamento, os animais tiveram os seus níveis glicêmicos avaliados durante as seis primeiras horas após a aplicação do LPS ou salina. Para isto, uma gota de sangue foi coletada através da cauda, a cada intervalo de uma hora. Ao final da sexta hora, os animais foram eutanasiados por decapitação e amostras de sangue (2 a 3 ml) coletadas em tubos contendo EDTA e centrifugadas (1000 g por 10 min. a 4°C) para separação do plasma (figura 5). Além disso, após eutanásia, o fígado foi

coletado para análise dos níveis teciduais das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, além da enzima PEPCK.



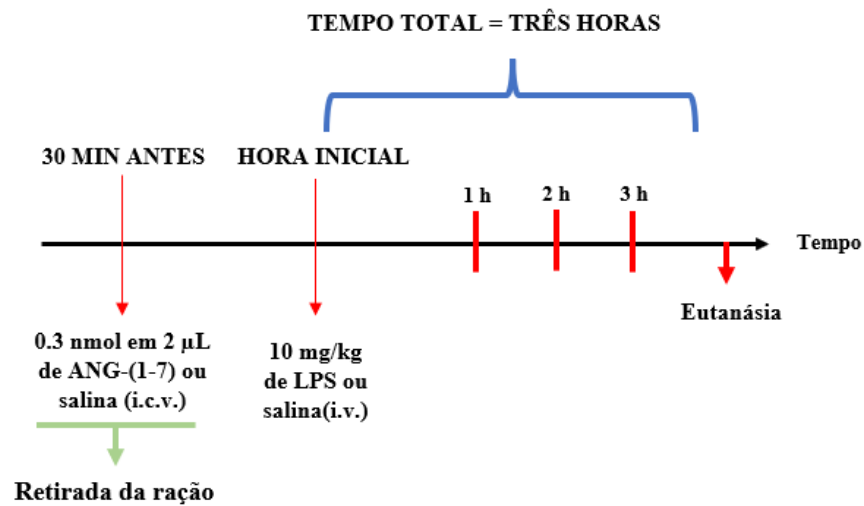
**Figura 5.** Representação em esquema do respectivo protocolo experimental.

A realização da eutanásia deu-se pela técnica de decapitação sem anestesia prévia para que houvesse alterações nos dados a serem analisados. Sabe-se que o uso de anestesia prévia a decapitação pode interferir no resultado final da pesquisa, e isso deve-se a mudanças hormonais, na concentração de citocinas e do EROs (GARCIA; ISSY; SAKATA, 2002). Deste modo, foram seguidas as recomendações do RN37 do CONCEA, onde a aplicação desta técnica é recomendada a estudos que não permitem o uso de outro método.

#### 3.4.5.2. Protocolo experimental II –

Sete dias antes do tratamento com salina ou ANG-(1-7), os animais foram submetidos a cirurgia de estereotaxia. Então, um dia antes do tratamento, os animais passaram pela cirurgia de canulação da veia jugular externa, e no dia seguinte, trinta minutos antes da realização do experimento, tiveram as suas rações retiradas, para a realização do jejum (YANAY *et al.*, 2015). Trinta minutos após a administração de salina ou ANG-(1-7) (0.3 nmol em 2 µL) (i.c.v.) foi aplicada salina ou LPS (10 mg/Kg) (e.v.). Três horas após a injeção de LPS, os ratos foram decapitados e o sangue e fígado foram coletados para posteriormente serem verificados os níveis de citocinas pró-

inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e anti-inflamatórias (IL-10), bem como a expressão enzimática de PEPCK (figura 6).



**Figura 6.** Representação em esquema do respectivo protocolo experimental.

### 3.5. Análise estatística

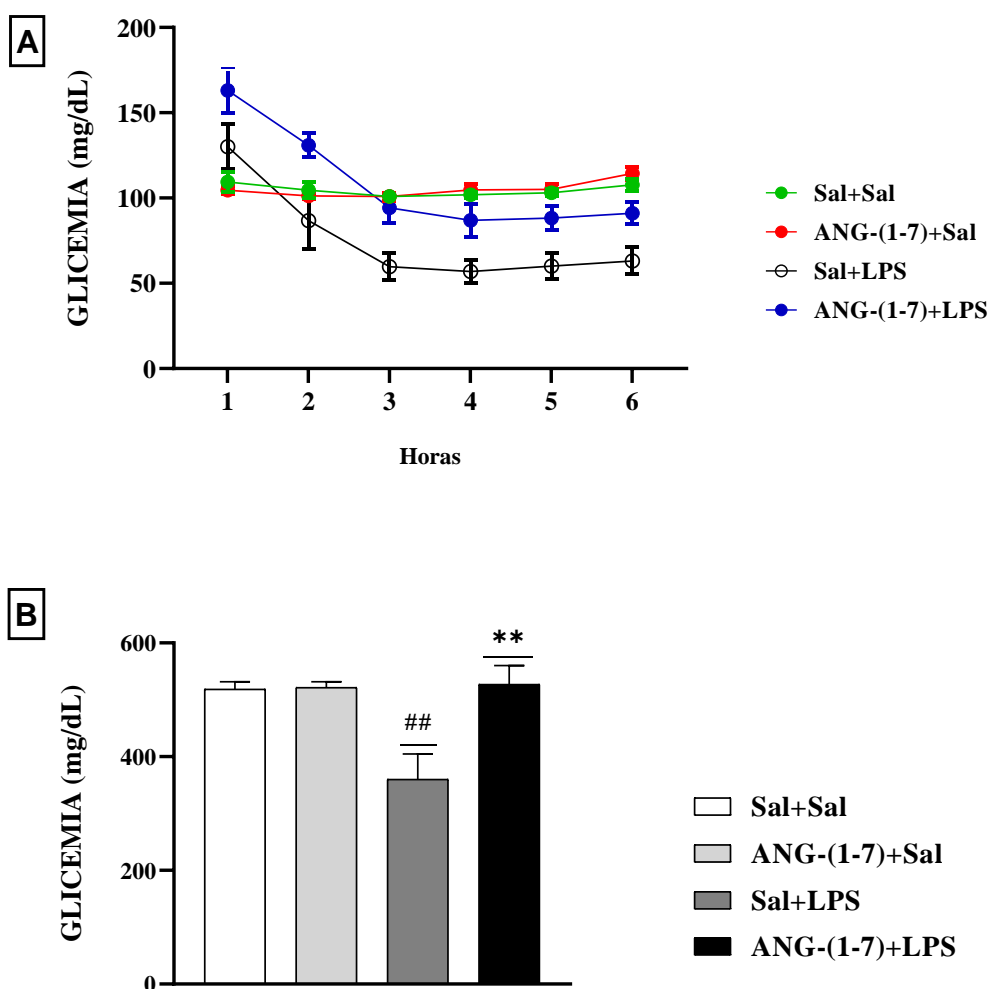
Os valores obtidos estão expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) do número de animais utilizados em cada experimento e foram submetidos a análise estatística adequada. Para análise dos resultados unidirecionais, foi utilizada a análise de variância ANOVA *one-way*, e para análises bidirecionais, utilizou-se o ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak para detectar possíveis diferenças entre os valores de cada grupo. No respectivo estudo, foi considerado o nível de significância de 5%, com  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

## ***RESULTADOS***

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação dos níveis glicêmicos entre os intervalos de 1 a 6 horas.

Com objetivo de compreender o perfil glicêmico de ratos submetidos ao choque endotoxêmico e tratados com ANG-(1-7) central, a glicemia foi coletada entre os intervalos a partir da 1ª a 6ª hora após a administração da ANG-(1-7) central e do LPS. Como observado, os animais submetidos ao choque endotoxêmico desenvolveram queda dos níveis glicêmicos a partir da 2ª hora, havendo uma queda brusca dos níveis glicêmicos na 3ª hora, permanecendo até a 6ª hora, como demonstrado na figura 7A.



**Figura 7. Avaliação dos níveis glicêmicos de ratos sépticos tratados com salina ou ANG-(1-7).** (A) Avaliação da glicemia entre a 1ª e a 6ª hora após administração da ANG-(1-7) e LPS. (B) Área sob a Curva da glicemia entre a 1ª e a 6ª hora após injeção de ANG-(1-7) e LPS. \* Dados analisados por meio do teste ANOVA *two-way* e *one-way*, respectivamente, com pós-teste de Holm-Sidak para detectar possíveis diferenças entre os valores de cada grupo. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001

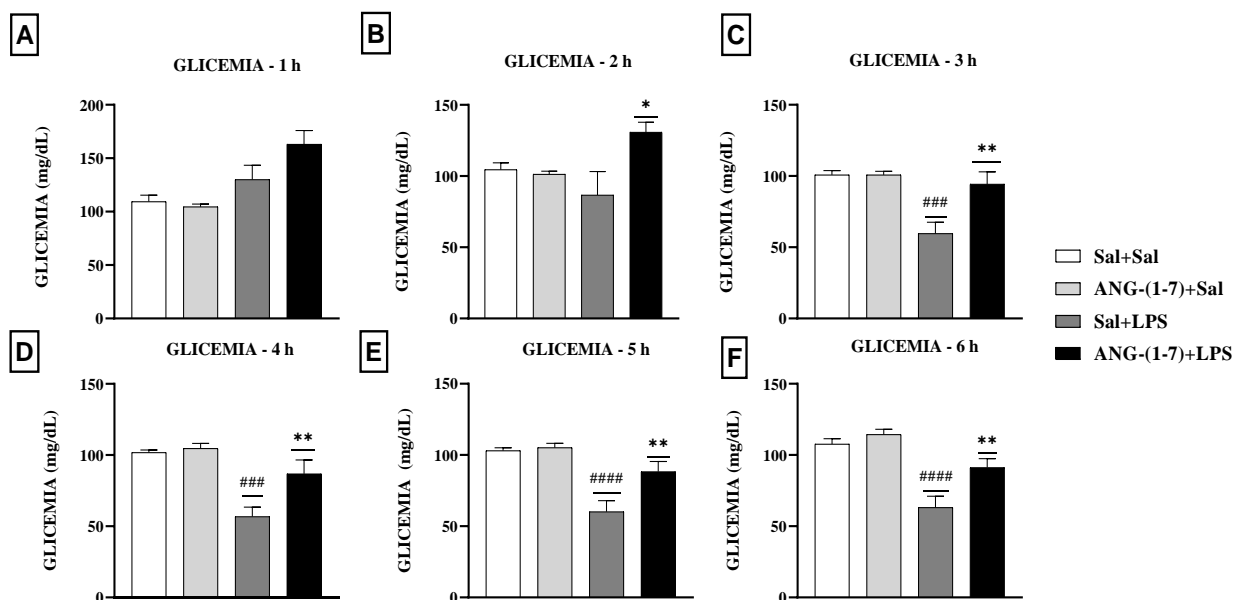


Ao avaliarmos os valores glicêmicos e o efeito do tratamento ao longo do tempo, nota-se que os animais sépticos desenvolveram hipoglicemia quando comparado com os animais controle ( $p < 0.01$ ) (figura 7B). Além disso, podemos observar que o tratamento com ANG-(1-7) foi capaz de atenuar a hipoglicemia em ratos submetidos ao choque endotoxêmico ( $p < 0.01$ ).

#### *4.1.2. Níveis glicêmicos avaliados nos intervalos de 1 a 6 horas.*

Como descrito acima, os animais tiveram a sua glicemia avaliada desde a 1ª a 6ª hora após administração de ANG-(1-7) e LPS. É possível notar que não houve diferenças nos níveis glicêmicos de ambos os grupos na 1ª hora. Entretanto, na 2ª hora, os animais tratados com ANG-(1-7) obtiveram aumento da glicemia ( $p < 0.05$ ) (figura 8B).

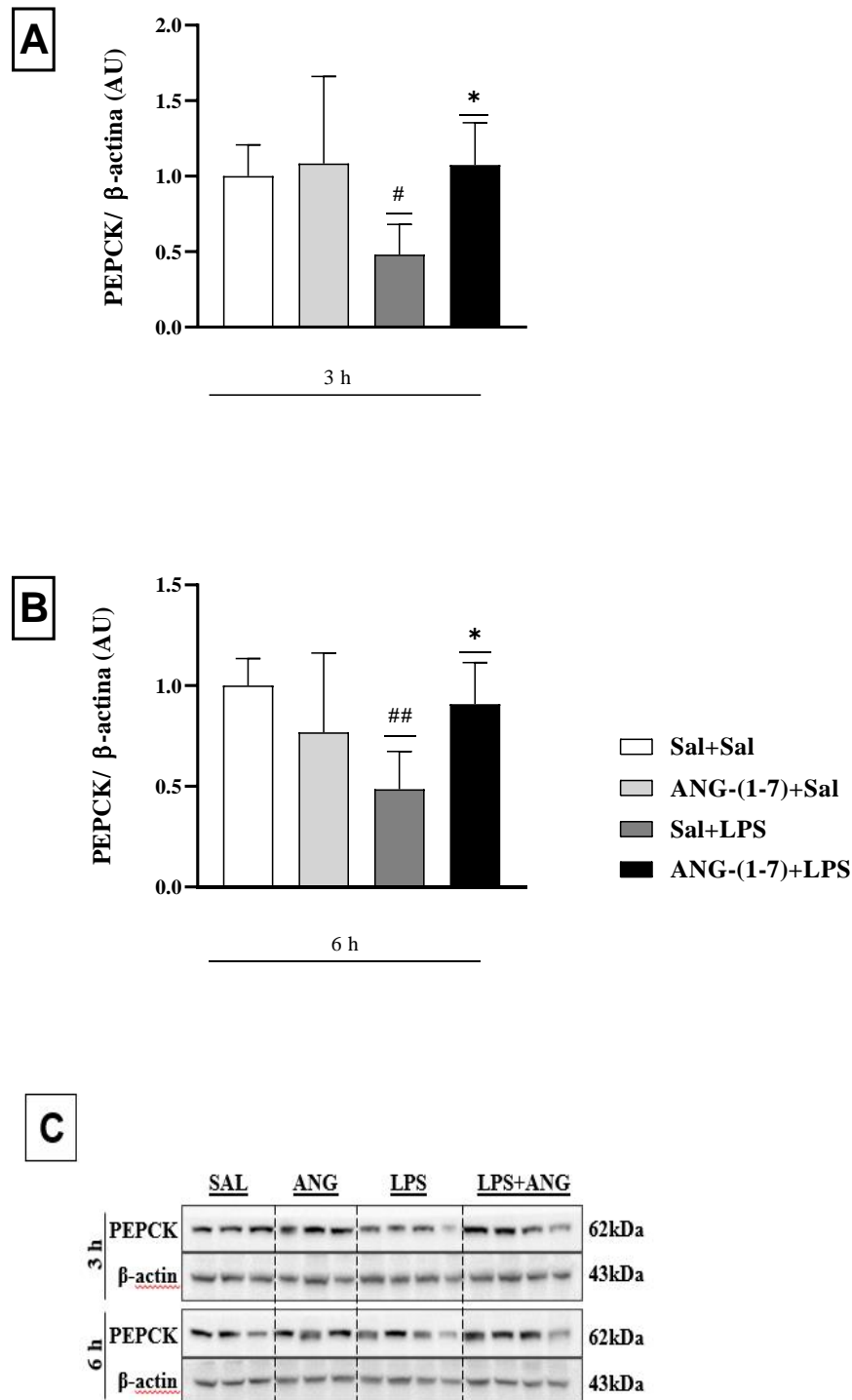
Ao observarmos a glicemia ao longo do tempo, como visto nos intervalos da 3ª a 6ª hora, podemos observar que os animais LPS desenvolveram uma hipoglicemia significativa quando comparados com os animais dos grupos controle ( $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respectivamente). Além do mais, podemos verificar que o tratamento prévio com ANG-(1-7) atenuou a hipoglicemia de animais submetidos ao desafio do LPS ( $p < 0.01$ ) (figura 8C, 8D, 8E e 8F).



**Figura 8. Valores médios dos níveis glicêmicos de ratos sépticos tratados com salina ou ANG-(1-7).** (A) Valor expresso em média e EPM da glicemia coletada na 1<sup>a</sup> h. (B) Valor expresso em média e EPM da glicemia coletada na 2<sup>a</sup> h. (C) Valor expresso em média e EPM da glicemia coletada na 3<sup>a</sup> h. (D) Valor expresso em média e EPM da glicemia coletada na 4<sup>a</sup> h. (E) Valor expresso em média e EPM da glicemia coletada na 5<sup>a</sup> h. (F) Valor expresso em média e EPM da glicemia coletada na 6<sup>a</sup> h. \* Dados analisados por meio do teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Holm-Sidak para detectar possíveis diferenças entre os valores de cada grupo. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001

#### 4.1.3. Expressão enzimática de PEPCK durante hipoglicemia induzida por choque endotoxêmico.

Como uma estratégia para avaliar o comprometimento na via da neoglicogênese de ratos submetidos ao choque endotoxêmico, foi realizado o *Western blot*, onde verificou-se que o quadro instalado de inflamação sistêmica resultou em uma redução da expressão enzimática de PEPCK na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora após injeção de LPS (figura 9A e 9B) ( $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , respectivamente). Como já descrito acima, os níveis glicêmicos dos animais submetidos ao desafio do LPS tendem a cair a partir da 3<sup>a</sup> hora e permanecem baixos até a 6<sup>a</sup> hora, coincidindo assim, com os resultados obtidos de PEPCK.

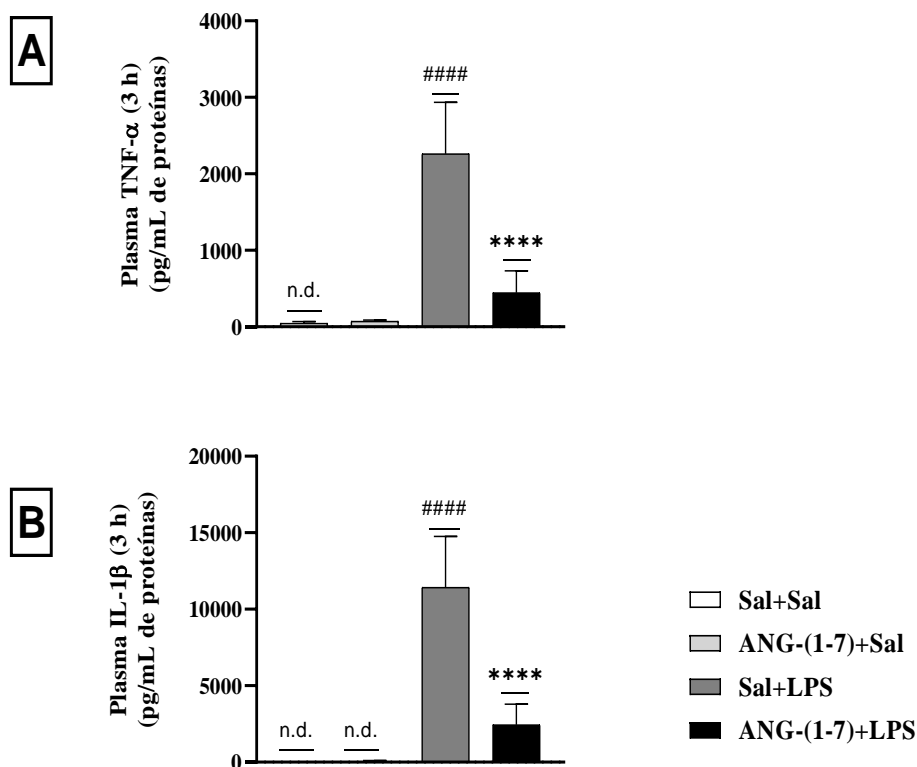


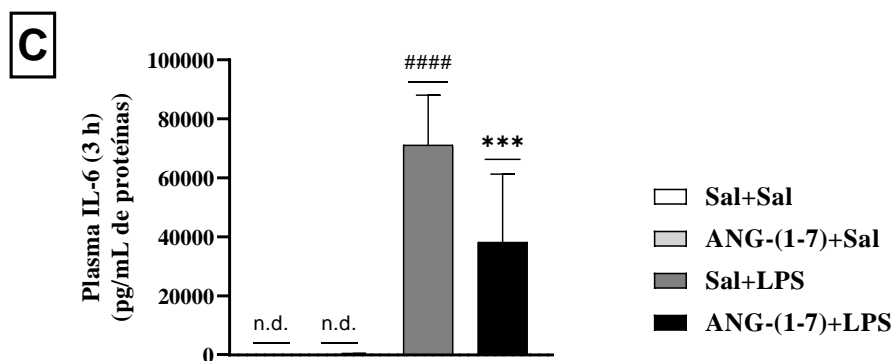
**Figura 9. Expressão enzimática de PEPCK.** (A e B) Expressão enzimática de PEPCK na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora após administração de LPS, respectivamente. (C) Figura representativa dos Western blots, onde é possível observar o estado de fosforilação da PEPCK. Para análise, foi realizado o ANOVA *one-way* seguido de pós teste de Holm-Sidak. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001

Ao avaliar a expressão de PEPCK dos animais submetidos ao choque endotoxêmico e tratados com ANG-(1-7) central, nossos resultados demonstram que este tratamento foi capaz de atenuar a inibição da expressão de PEPCK na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora após injeção de LPS ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.4. Efeito do tratamento com a administração central de ANG-(1-7) na inflamação sistêmica.

Visto que a administração de LPS é responsável por ocasionar aumento das citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, com consequente desenvolvimento de um quadro séptico, tornou-se necessário investigar as concentrações plasmática destas citocinas na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora após injeção de LPS. Os dados a seguir demonstram que o LPS *e.v.* foi capaz de aumentar os níveis sistêmicos destes mediadores pró-inflamatórios na 3<sup>a</sup> hora, quando comparados com os grupos controle ( $p < 0.0001$ ) (figura 10A, 10B e 10C).

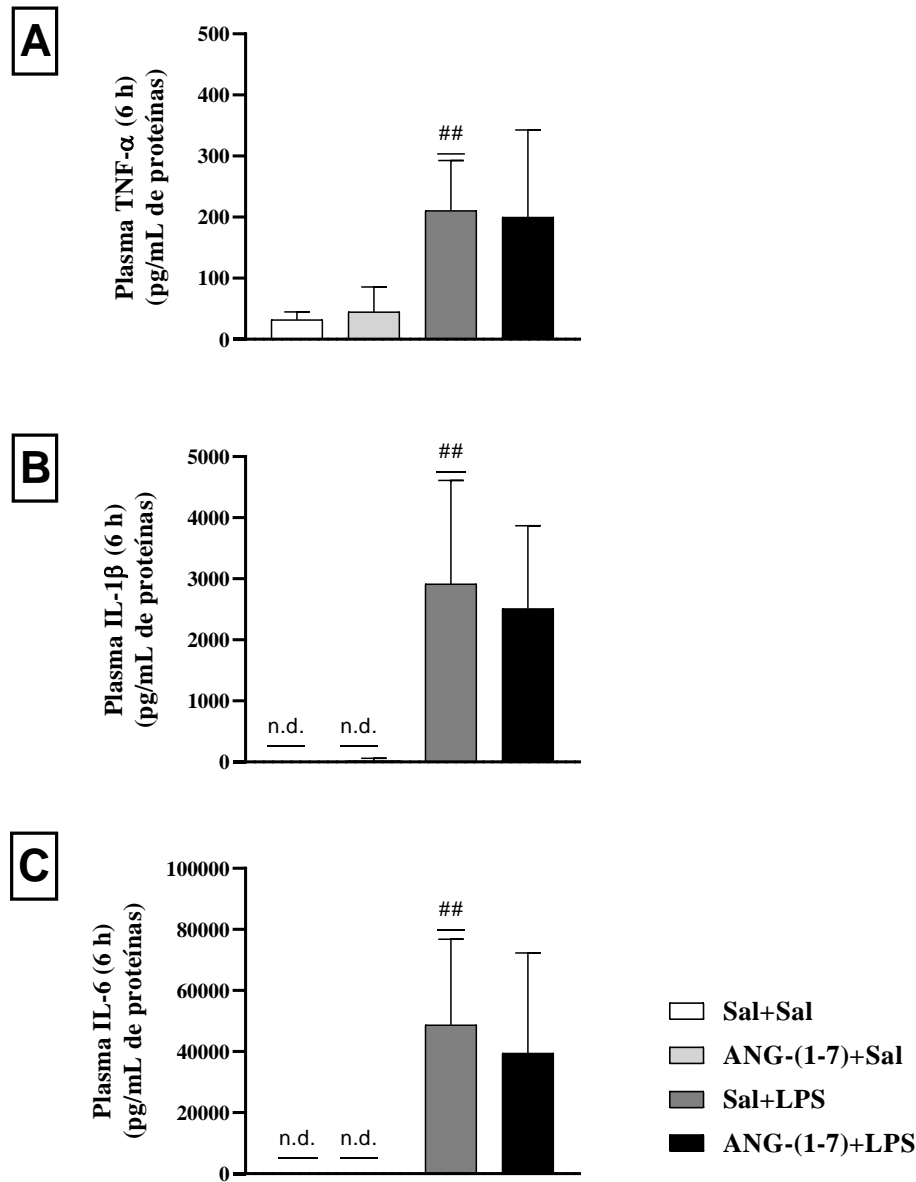




**Figura 10. Concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias na 3ª hora de choque endotoxêmico. (A, B e C) Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.** Para análise, foi realizado o ANOVA *one-way* seguido de pós teste de Holm-Sidak. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001

Além disso, o tratamento com ANG-(1-7) foi responsável por reduzir de forma significativa as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 plasmáticas, observada na 3ª hora, repercutindo na redução da instalação do quadro de inflamação sistêmica (figura 10A, 10B e 10C) ( $p < 0.0001$  e  $p < 0.001$ , respectivamente).

Ao avaliarmos o efeito da administração *e.v.* de LPS a longo prazo, durante a 6ª hora, foi possível observar que a indução a inflamação sistêmica aumentou as concentrações plasmáticas dos mediadores pró-inflamatórios ( $p < 0.01$ ). No entanto, o tratamento com a ANG-(1-7) não foi capaz de reduzir de forma significativa o quadro inflamatório, apresentando apenas uma tendência a redução do mesmo (figura 11A, 11B e 11C).

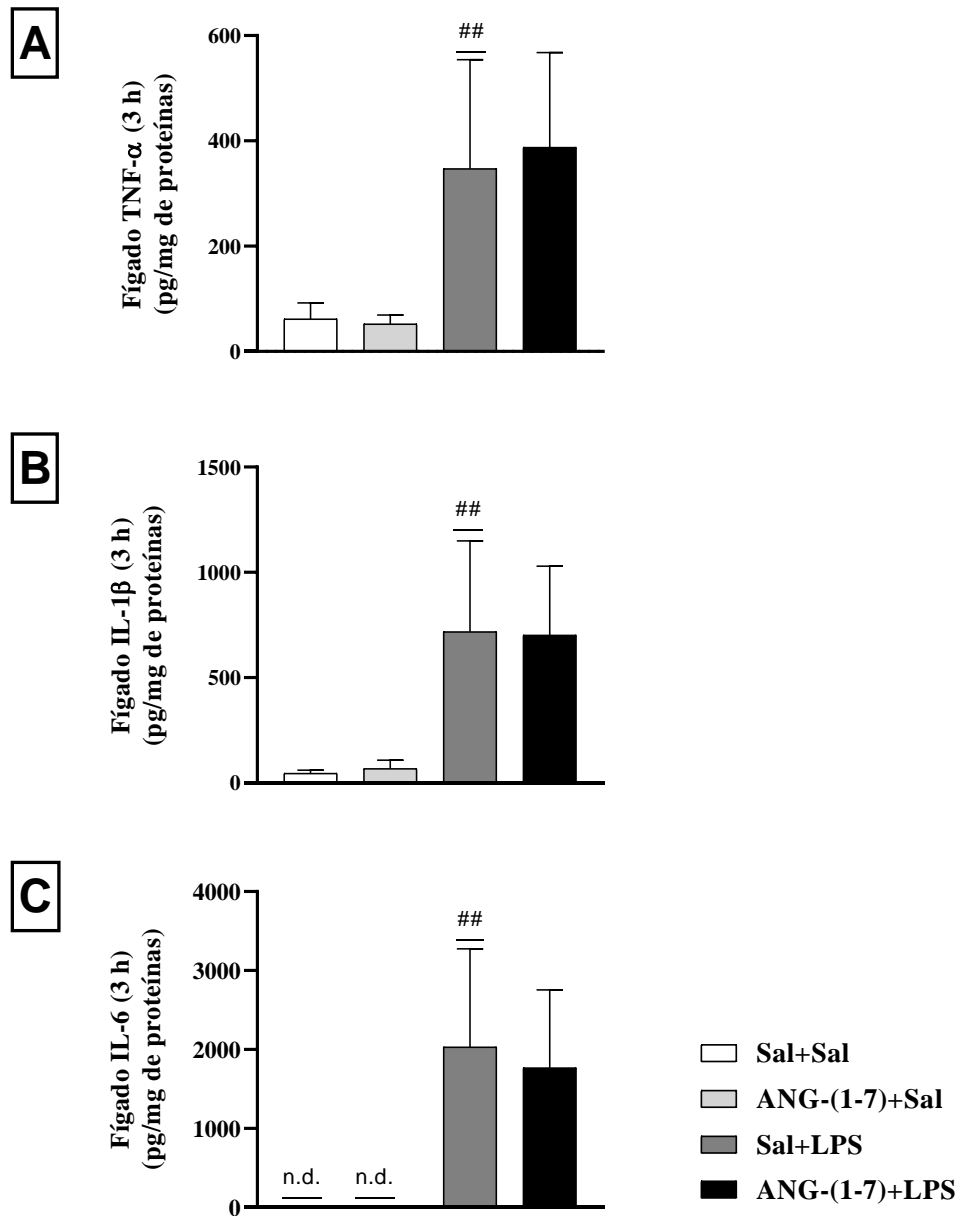


**Figura 11. Concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias na 6ª hora de choque endotoxêmico. (A, B e C) Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Para análise, foi realizado o ANOVA *one-way* seguido de pós teste de Holm-Sidak. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001**

#### 4.1.5. Participação do tratamento com a administração central de ANG-(1-7) na concentração hepática de citocinas pró-inflamatórias.

Para compreender a ação anti-inflamatória da ANG-(1-7) em tecido hepático, o fígado foi coletado na 3ª e 6ª hora após LPS. Nossos dados demonstram que a injeção de LPS resultou em inflamação hepática derivada do aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias no fígado ( $p < 0.01$ ). Todavia, o tratamento com ANG-(1-7) central não

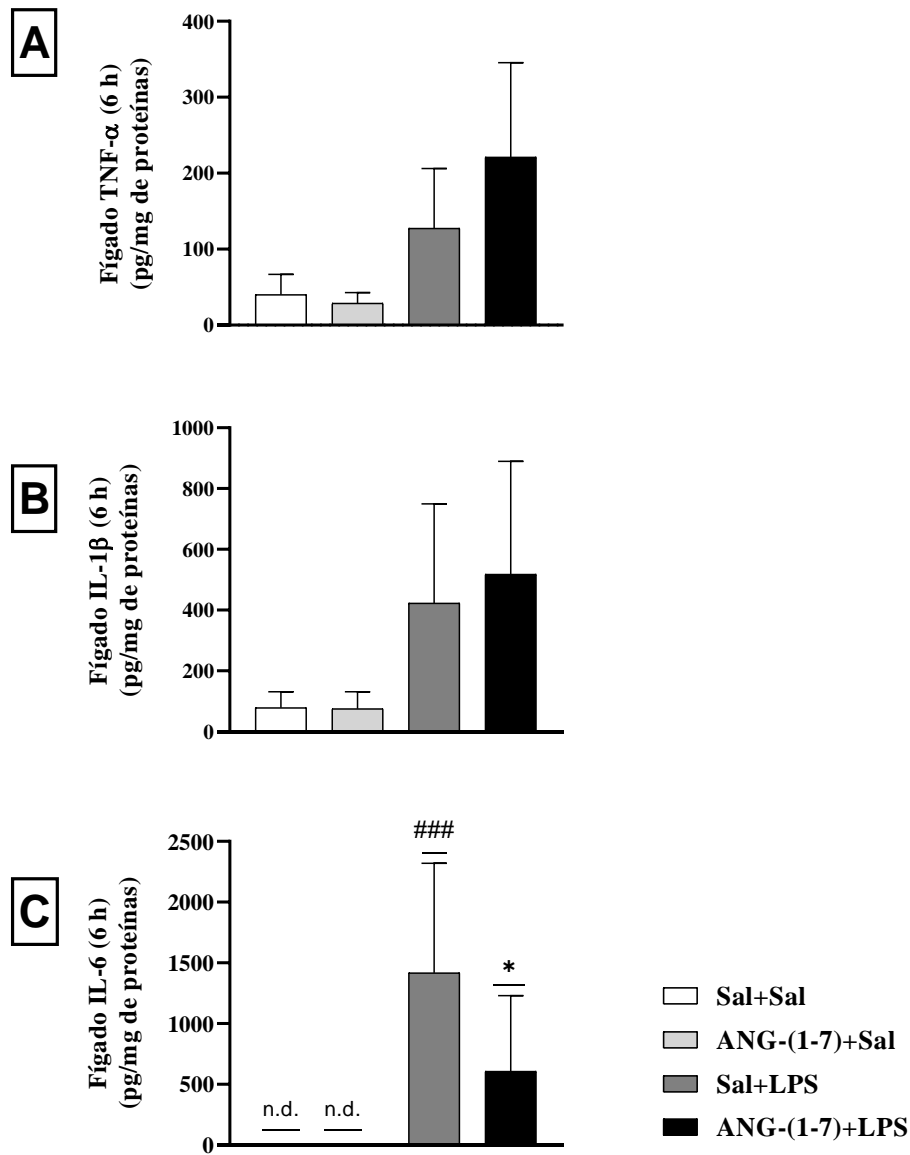
foi capaz de alterar significativamente a concentração hepática de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 na 3<sup>a</sup> hora (figura 12A, 12B e 12C).



**Figura 12. Concentração de citocinas pró-inflamatórias na 3<sup>a</sup> hora de choque endotoxêmico. (A, B e C) Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Para análise, foi realizado o ANOVA *one-way* seguido de pós teste de Holm-Sidak. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001**

Em adição, durante a 6<sup>a</sup> hora, a administração *e.v.* de LPS foi capaz de aumentar as concentrações teciduais hepáticas de IL-6, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.001$ ). No entanto, não houve diferença significativa nos níveis teciduais de TNF- $\alpha$

e IL-1 $\beta$  dos animais sépticos. Além disso, os animais tratados com ANG-(1-7) apresentaram redução significativa dos níveis hepáticos de IL-6 ( $p < 0.05$ ), apontando que o efeito da droga pode variar conforme com o tecido alvo, bem como de acordo com a cinética das citocinas pró-inflamatórias do respectivo tecido (figura 13A, 13B e 13C).

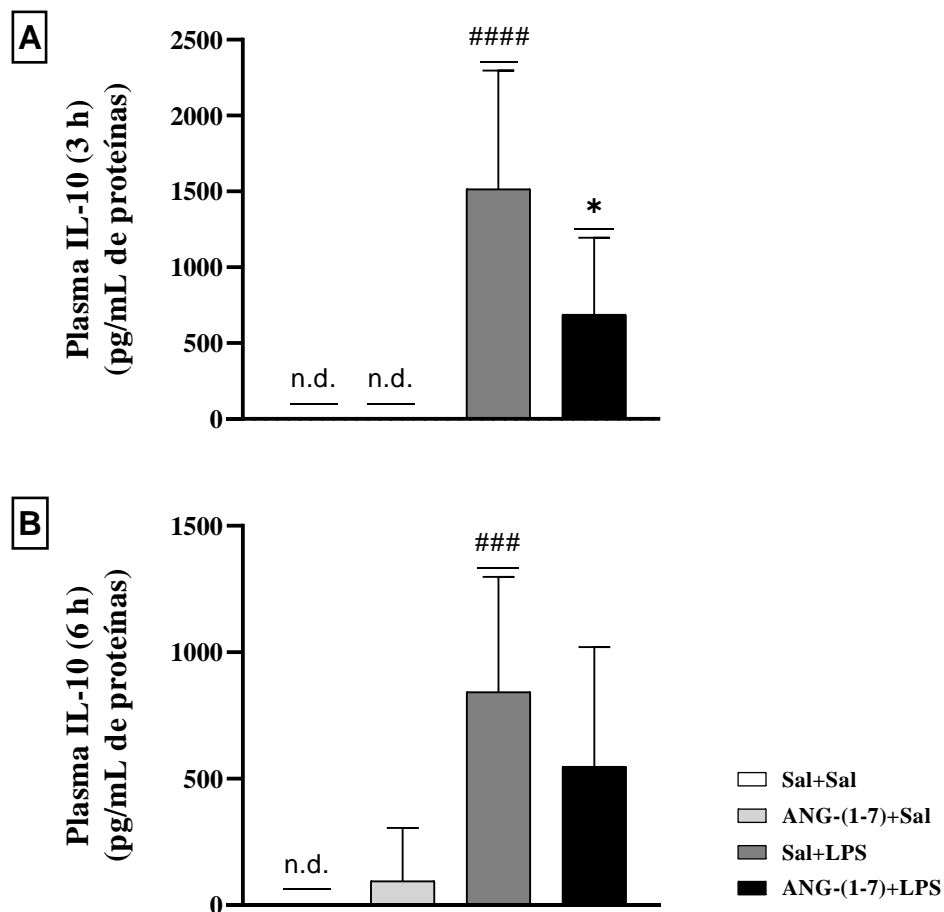


**Figura 13. Concentração hepática de citocinas pró-inflamatórias na 6ª hora de choque endotoxêmico. (A, B e C) Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.** Para análise, foi realizado o ANOVA *one-way* seguido de pós teste de Holm-Sidak. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001



4.1.6. Ação central da ANG-(1-7) na concentração de IL-10 plasmática, importante citocina anti-inflamatória.

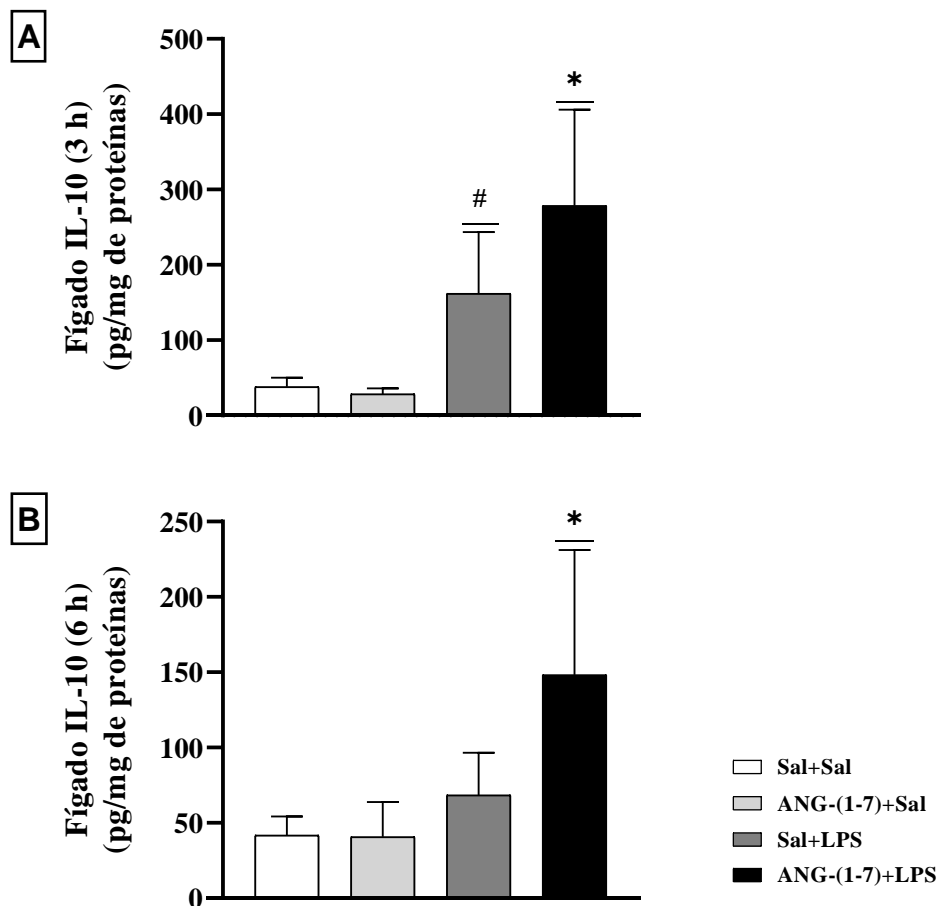
Em seguida, avaliou-se a concentração de IL-10 plasmática com o propósito de compreender o perfil anti-inflamatório dos animais. A exposição ao LPS resultou em aumento a concentração de IL-10 na 3ª e 6ª hora, constatando que a injeção de LPS induz ao aumento de IL-10 sistêmico como mecanismo de regulação do equilíbrio inflamatório ( $p < 0.0001$  e  $p < 0.001$ , respectivamente). Nossos resultados também mostram que o grupo tratado com ANG-(1-7) apresentou redução na produção de IL-10 na 3ª hora, o que sugere que estes animais obtiveram uma atenuação do quadro inflamatório ( $p < 0.05$ ). Todavia, não foi observada diferença significativa nos níveis de IL-10 durante a 6ª hora (figura 14A e 14B).



**Figura 14. Concentração sistêmica de IL-10, citocina anti-inflamatória, na 3ª e 6ª hora de choque endotoxêmico. (A e B) Concentração plasmática de IL-10. Para análise, foi realizado o ANOVA *one-way* seguido de pós teste de Holm-Sidak. N por grupo= 6-7 animais. P\* < 0.05; P\*\* < 0.01; P\*\*\* < 0.001; P\*\*\*\* < 0.0001**

#### 4.1.7. Papel central da ANG-(1-7) na concentração de IL-10 hepática durante o choque endotoxêmico.

Com a intenção de investigar as propriedades anti-inflamatórias da ANG-(1-7) central no tecido hepático, foi avaliada a concentração de IL-10 durante a 3ª e a 6ª hora de choque endotoxêmico. Assim, podemos observar que a injeção de LPS foi capaz de aumentar significativamente os níveis de IL-10 hepático na 3ª hora durante o choque endotoxêmico ( $p < 0.05$ ), porém não houve diferença nos níveis hepáticos de IL-10 durante a 6ª hora, certificando que estes animais possuem elevação de IL-10 sistêmica como mecanismo de ajuste da inflamação (figura 15A e 15B).



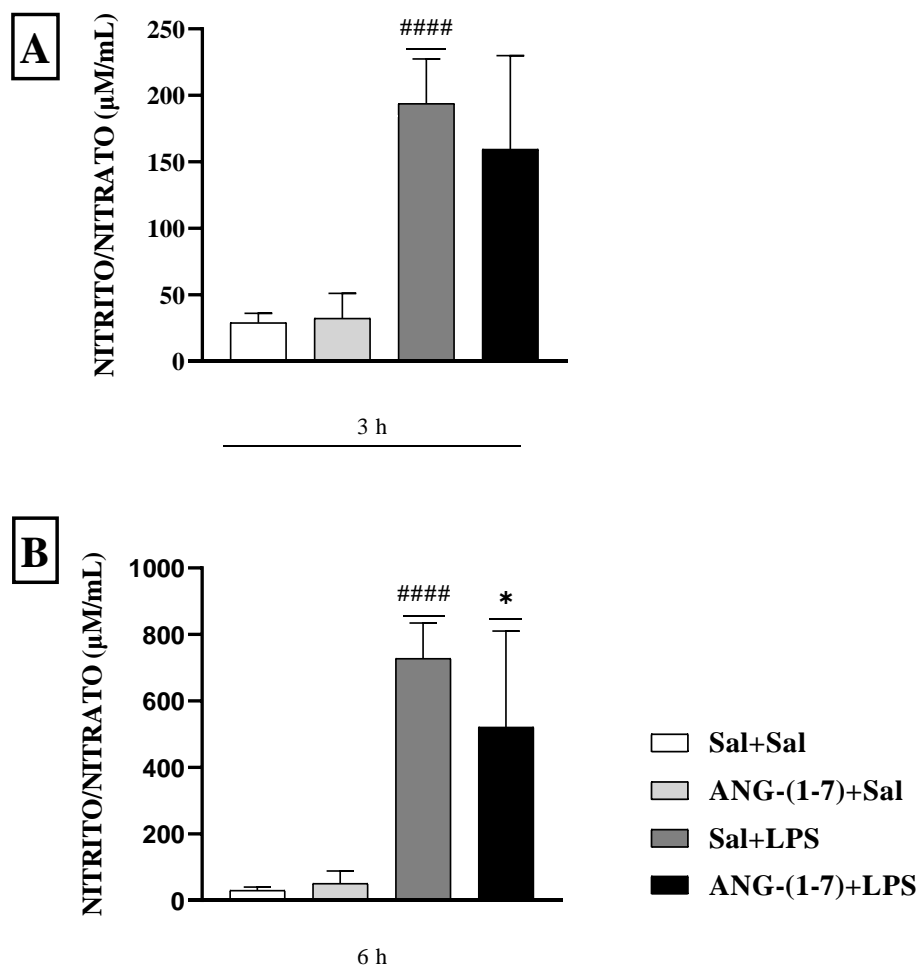
**Figura 15. Concentração hepática de IL-10, citocina anti-inflamatória, na 3ª e 6ª hora de choque endotoxêmico. (A e B) Concentração hepática de IL-10. Para análise, foi realizado o ANOVA *one-way* seguido de pós teste de Holm-Sidak. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001**

Ao avaliarmos a concentração de IL-10 nos animais tratados com ANG-(1-7), podemos observar que a droga foi capaz de aumentar as concentrações hepáticas desta citocina na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora ( $p < 0.05$ ). Em suma, a ANG-(1-7) parece atuar na regulação anti-inflamatória do fígado durante o desafio do LPS, ajustando a cinética das citocinas, no decorrer da inflamação hepática (figura 15A e 15B).

#### *4.1.8. Participação central da ANG-(1-7) na concentração plasmática de NOx durante o choque endotoxêmico.*

O NOx é uma molécula de sinalização que está envolvida em vários processos fisiológicos e compreendendo a sua relação com o estabelecimento de patologias, tornou-se necessário avaliar os seus respectivos níveis plasmáticos. Com o objetivo de compreender melhor a relação do LPS e da ANG-(1-7) na sua síntese, as concentrações plasmáticas de NOx foram avaliadas.

Nossos dados demonstram que a indução a inflamação sistêmica por meio da administração de LPS *e.v.* foi capaz de aumentar significativamente ( $p < 0.0001$ ) as concentrações plasmáticas de NOx, quando comparado com os grupos controles (figura 16A e 16B).



**Figura 16. Concentração plasmática de NOx na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora de choque endotoxêmico.** (A e B) Concentração plasmática de NOx. Para análise, foi realizado o ANOVA *one-way* seguido de pós teste de Holm-Sidak. N por grupo= 6-7 animais. P\* <0.05; P\*\* <0.01; P\*\*\* <0.001; P\*\*\*\* <0.0001

Além do mais, nossos resultados também revelam que o tratamento com ANG-(1-7) não foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de NOx na 3<sup>a</sup> hora; já na 6<sup>a</sup> hora, a ANG-(1-7) foi capaz de atenuar de forma significativa as concentrações de NOx durante o choque endotoxêmico ( $p < 0.05$ ). Provavelmente este resultado se deva a ação anti-inflamatória da ANG-(1-7), que atuou reduzindo as concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, como resultado, a expressão de NOx (figura 16A e 16B).

***DISCUSSÃO***

## 5. DISCUSSÃO

Nesse estudo nós avaliamos a ação da administração central da ANG-(1-7) na hipoglicemia induzida por choque endotoxêmico em ratos. Demonstramos que a administração de ANG-(1-7) central atuou reduzindo as concentrações de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO $_x$ , podendo dessa forma ser responsável pela atenuação na hipoglicemia de ratos submetidos ao choque endotoxêmico, bem como no aumento da expressão enzimática de PEPCCK.

A administração de LPS é responsável por desencadear a ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4) levando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, sendo este, um dos modelos mais utilizados para a compreensão dos mecanismos presentes na inflamação (MEDZHITOV; JANEWAY JR., 2002). Neste estudo, a administração endovenosa de LPS ocasionou a instalação de um processo inflamatório caracterizado por elevação das concentrações plasmáticas e hepáticas de citocinas pró-inflamatórias, além do desenvolvimento da hipoglicemia.

Ao utilizarmos esse modelo, é possível notar que a ação do LPS é acompanhada por ativação de células do sistema imune inato, como os macrófagos, resultando em produção exacerbada de citocinas e NO $_x$ , este último através da ativação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (MARROCCO; ORTIZ, 2022; BRAVERMAN; STANLEY, 2017; DOMINGUEZ *et al.*, 2018). Nossos achados mostram que a injeção de LPS levou a um aumento nas concentrações plasmáticas de citocinas, como IL-10, a partir da 3ª hora de choque endotoxêmico. Uma explicação breve para a elevação de IL-10 talvez esteja no equilíbrio inflamatório instalado após LPS, em uma tentativa orgânica de amenizar a inflamação. Esses dados vão ao encontro com estudos que demonstraram o efeito da injeção de LPS (10 mg/kg, *i.p.*) na produção de citocinas como TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 durante a 3ª hora de choque endotoxêmico (LO *et al.*, 2004).

O sistema imune é essencial para a proteção do organismo contra um patógeno, porém, em condições como vistas no choque endotoxêmico, ocorre o estímulo e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, gerando assim, um quadro patológico. Neste trabalho nós mostramos que a inflamação sistêmica e hepática exacerbada em animais que receberam LPS está diretamente relacionada com distúrbios da via da neoglicogênese, mais especificamente, a hipoglicemia, resultado da inibição da PEPCCK.

Como já citado anteriormente, o choque endotoxêmico é responsável por estimular disfunções metabólicas, dentre estas, alterações no metabolismo da glicose. Nossos dados demonstram que os animais que receberam LPS desenvolveram um quadro de hipoglicemia, provavelmente decorrente da elevação da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias e NOx a partir da 3ª hora após a injeção da droga, e que esses efeitos alteraram o metabolismo da glicose, levando a redução da expressão enzimática de PEPCK, importante enzima da neoglicogênese. Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Yanay *et al.* (2015), que observaram a instalação do quadro de hipoglicemia três horas após injeção de LPS em ratos (10 mg/kg). Este estudo também demonstrou que a queda brusca dos níveis glicêmicos em animais com choque endotoxêmico está diretamente relacionada com o aumento de mediadores inflamatórios, que se dá, inicialmente, através da maior síntese e liberação de TNF- $\alpha$  na 3ª hora.

A hipoglicemia endotóxica é um fator crítico nos índices de mortalidade de pacientes sépticos (KRINSLEY; GROVER, 2007; WAESCHLE *et al.*, 2008). Trabalhos recentes têm mostrado que o LPS e o TNF- $\alpha$  agem reduzindo a expressão de PEPCK no fígado, porém, este efeito deletério foi perdido quando o LPS foi administrado em camundongos knockout para TLR4 (FEINGOLD *et al.*, 2012). Assim, podemos compreender e afirmar que a ação do LPS na instalação do quadro de hipoglicemia se dá por meio da sua interação com o seu receptor TLR4, interação esta responsável pela produção de citocinas como o TNF- $\alpha$  e IL-1. Como já descrito, durante a hipoglicemia, o fígado é um dos órgãos mais acometidos pelos efeitos deletérios da ação do LPS. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que animais com choque endotoxêmico possuem elevação na concentração tecidual de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e NOx (PASSAGLIA *et al.*, 2020). A presente pesquisa obteve dados que se assemelham ao do estudo realizado anteriormente em nosso laboratório. Desta forma, notou-se que a injeção endovenosa de LPS foi responsável por elevar de forma significativa as concentrações teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NOx e IL-10, sendo a elevação desta última citocina, um mediador anti-inflamatório, um possível mecanismo para estabelecer o equilíbrio inflamatório.

Um outro importante mediador inflamatório é o NOx, produto derivado da instalação do quadro inflamatório induzido por LPS. O NOx, quando sintetizado e liberado em grandes concentrações, como visto em nossos resultados durante 3ª e 6ª

hora, pode inibir a síntese de glicose. Deste modo, estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, tem discutido que a maior expressão proteica de iNOS correlacionam-se com a inibição da expressão da PEPCK, com conseqüente redução da neoglicogênese hepática. Além disso, outras pesquisas tem demonstrado que uma vez inibida a iNOS, o efeito deletério do LPS é atenuado, e a síntese de NO<sub>x</sub> é reduzida (HORTON; KNOWLES; TITHERADGE, 1994; WU *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1999). Embora não se tenha avaliado a expressão proteica de iNOS em nosso estudo, a hipoglicemia induzida por LPS parece estar relacionada com níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, e com maior expressão e liberação de iNOS e NO<sub>x</sub>, respectivamente.

Uma vez que a funcionalidade hepática está prejudicada devido a ação do LPS, bem como de mediadores inflamatórios, pesquisas tem relatado que o aumento da expressão de iNOS por mediação de citocinas inflamatórias leva ao comprometimento do metabolismo hepático da glicose, diminuindo AMP cíclico (cAMP) e a glicogenólise estimulada por glucagon, além de aumentar consideravelmente a atividade da glicogênio fosforilase e a diminuição da atividade da glicogênio sintase (MOLINA y VEDIA, *et al.*, 1992; SHINOZAKI *et al.*, 2011). Nossos resultados coincidem com os dados descritos acima, visto que os animais que receberam LPS tiveram aumento do quadro inflamatório e das concentrações plasmáticas de NO<sub>x</sub>, com queda da glicemia no mesmo intervalo de tempo, ou seja, a partir da terceira até a sexta hora de choque endotoxêmico. Assim, sugerimos que a hipoglicemia induzida pelo LPS possa ser decorrente do processo inflamatório.

Nossos resultados demonstram que a glicemia de animais LPS tendem a cair ao longo do tempo, mediante o aumento da inflamação. Nota-se, deste modo, que a glicemia destes animais tende a cair a partir da 2<sup>a</sup> hora, momento em que ocorre o pico na produção de mediadores inflamatórios, permanecendo em níveis inferiores a  $\leq 70$  mg/dL até a 6<sup>a</sup> hora após injeção de LPS. No estudo realizado por Vachharajani *et al.*, (2019), os autores descrevem que a fase hiperinflamatória da sepse é marcada por ativação de células imunes efetores responsáveis por eliminar patógenos, e que este processo consome grandes quantidade de energia na forma de ATP, que posteriormente será utilizado para a diferenciação celular. Os autores ainda descrevem que durante o estresse extremo ocorre a glicólise para o fornecimento de ATP, que será direcionado para células do sistema imune.



O organismo utiliza de diversos mecanismos para o controle de situações como vistas durante a inflamação sistêmica, dentre estes, ocorre a ativação de sinais neuroimunes, oriundos da periferia, que interagem diretamente com o Sistema Nervoso Central (SNC) para o controle da inflamação. Dados recentes têm mostrado que vias neuroimunes simpáticas atuam na regulação da inflamação sistêmica, e uma das suas ações se dá por meio dos corpos carotídeos, que detectam os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  circulante e, por meio deste, estimulam o reflexo anti-inflamatório simpático (KATAYAMA *et al.*, 2022).

Além da ativação de vias aferentes por receptores periféricos, como visto durante a ativação dos corpos carotídeos, vias neuroimunes eferentes simpáticas podem atuar também no controle da inflamação mediante estímulo central. Um modelo padronizado em nosso laboratório, e realizado por Passaglia *et al.*, (2020), demonstrou pela primeira vez que a injeção central de ANG-(1-7), por meio da sua interação com o seu receptor Mas, é capaz de estimular vias neuroimunes simpáticas eferentes, que agem exercendo sua ação anti-inflamatória a nível sistêmico (plasmático) e hepático. Em nossa pesquisa, como já descrito, também foi realizada a administração central de ANG-(1-7) em animais submetidos ao desafio do LPS. Aqui, nós observamos que a ANG-(1-7) foi capaz de reduzir a inflamação sistêmica e hepática por meio de mecanismos já descritos, tendo assim, como consequência, a atenuação da hipoglicemia.

A ANG-(1-7) é alvo de diversos estudos publicados na literatura, e em sua grande maioria, estes trabalhos apontam os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes deste heptapeptídeo. Em experimento realizado *in vitro* com macrófagos peritoneais, o tratamento com ANG-(1-7) foi capaz de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos por LPS (SANTUCHI *et al.*, 2012). Os nossos achados nos possibilitam acreditar que a ANG-(1-7) é responsável por reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e NOx, estimulando o aumento na expressão de PEPCK.

Estudos realizados com o modelo de hipoglicemia induzida por LPS mostram os efeitos benéficos de tratamentos com propriedades anti-inflamatórias na redução da inflamação, com consequente aumento da expressão de PEPCK e da glicemia. A redução do quadro inflamatório está diretamente atrelada ao desenvolvimento do quadro hipoglicêmico e a taxa de sobrevivência em ratos. Os resultados obtidos nos mostram que os animais tratados com ANG-(1-7) apresentaram redução da inflamação sistêmica e hepática, possivelmente por meio da ativação de vias neuroimunes simpáticas, que

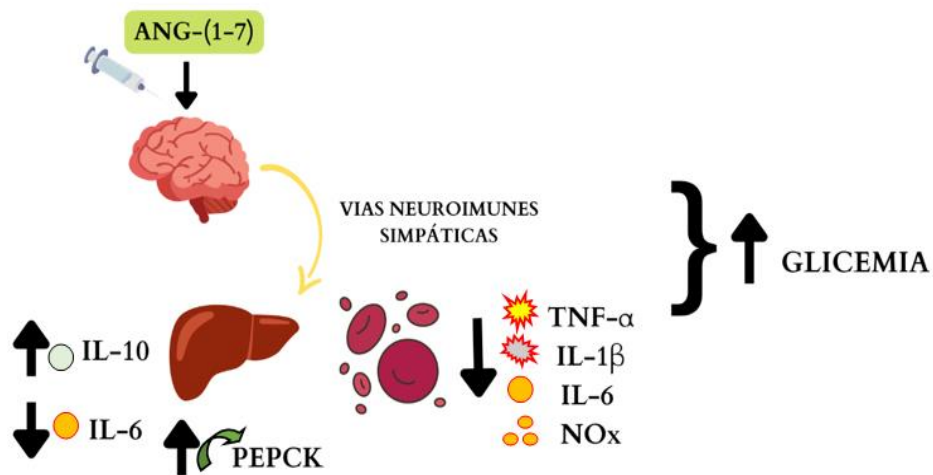
podem estar atuando através da redução da produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e NOx, além de estimular o aumento da síntese de IL-10. Esses dados se assemelham ao estudo realizado por JACOB *et al.*, 2010, que demonstrou a importância dos efeitos da ativação simpática na regulação da inflamação. Estes autores descreveram que um dos mecanismos da atividade neuroimune simpática se dá por meio da redução do recrutamento de células da imunidade inata em diferentes tecidos, como no fígado, amenizando a liberação de mediadores inflamatórios por meio da *downregulation* de macrófagos e das células de Kupffer.

Pesquisas prévias expuseram que as ações anti-inflamatórias da ANG-(1-7) no fígado se dá pela inibição da via de sinalização de citocinas inflamatórias. Xiao *et al.*, (2018) descreveram que este heptapeptídeo atua em hepatócitos inibindo a expressão da p38MAPK/AP-1 ativadas por ação do LPS. A proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK) e a proteína ativadora (AP)-1 são importantes fatores de transcrição que regulam a expressão e a síntese de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$ . Embora o presente estudo não tenha avaliado a expressão da via p38MAPK/AP-1, em nosso modelo pudemos observar que a ANG-(1-7) central aumentou a concentração hepática de TNF- $\alpha$ , no entanto, este heptapeptídeo foi capaz de reduzir significativamente as concentrações plasmáticas de NOx e dos níveis hepáticos de IL-6, além de elevar de forma significativa a síntese e concentração de IL-10 no fígado, amenizando assim, a inflamação local.

De acordo com os achados, a elevação nas concentrações hepáticas de IL-10 parece atuar na regulação do quadro inflamatório tecidual dos animais sépticos tratados, reduzindo a inflamação hepática. Nossos dados se assemelham ao estudo realizado por Oft (2014), onde descreveu que a IL-10 atua inibindo as células T inflamatórias (Th17) e macrófagos, reduzindo a síntese de citocinas TNF- $\alpha$  e interleucina-23 (IL-23). Ainda de acordo com este estudo, a ativação de STAT-3 mediada por IL-10 induz a inibição de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-23 por meio do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3). Assim, IL-10 é responsável por reduzir a resposta inflamatória induzida por LPS.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a ação anti-inflamatória da ANG-(1-7) central deu-se através da sua interação com o receptor Mas, que resultou em estimulação de vias neuroimunes simpáticas, como já descrito em estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa (Passaglia *et al.*, 2020). Nossos resultados demonstram pela

primeira vez que a administração central da ANG-(1-7) foi capaz de atenuar a hipoglicemia em animais sépticos por meio da sua ação em reduzir as concentrações plasmáticas e hepáticas das citocinas pró-inflamatórias. Em adição, acreditamos que o aumento da expressão de PEPCK e da via da neoglicogênese no fígado possam ser um resultado secundário em resposta a redução da inflamação observada nos animais sépticos tratados (figura 17).



**Figura 17. Proposta do mecanismo de ação do efeito protetor da ANG-(1-7) central em relação aos efeitos deletérios causados por LPS.** O LPS induziu a inflamação sistêmica e hepática através do aumento de citocinas pró-inflamatória e NOx, reduzindo a expressão de PEPCK, afetando, conseqüentemente, o metabolismo da glicose. A ação anti-inflamatória da ANG-(1-7) através da estimulação da via simpática neuroimunes eferente reduziu a inflamação sistêmica e hepática, aumentando a expressão enzimática de PEPCK, bem como a produção hepática de glicose.

## ***CONCLUSÃO***

## **6. CONCLUSÃO**

Em síntese, nossos resultados sugerem que o tratamento central com Angiotensina-(1-7) atuou reduzindo o quadro inflamatório a nível sistêmico e hepático, aumentando a expressão de PEPCK e restabelecendo a produção hepática de glicose em ratos submetidos ao choque endotoxêmico. Em geral, o tratamento com ANG-(1-7) central pode ser, futuramente, um possível alvo para controlar a hipoglicemia resultante de condições sépticas.

***PERSPECTIVAS***

## **7. PERSPECTIVAS**

Sugerimos a continuidade da pesquisa com ANG-(1-7) administrada via central. Há a necessidade da avaliação de importantes hormônios presentes durante situações de estresse, como corticosterona e catecolaminas, para que assim, possamos compreender melhor a relação da atividade anti-inflamatória da ANG-(1-7) com o desenvolvimento da hipoglicemia. Embora seja preciso realizar novas pesquisas, os resultados do presente estudo confirmam o efeito da ANG-(1-7) como possível método terapêutico para o controle de distúrbios metabólicos e sistêmicos decorrentes da instalação de um quadro séptico.

## ***REFERÊNCIAS***



## 8. REFERÊNCIAS

- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.
- ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med.** v. 29, n. 7, p. 1303–1310, 2001.
- ANTONUCCI, E. et al. Myocardial depression in sepsis: From pathogenesis to clinical manifestations and treatment. **Journal of Critical Care**, v. 29, n. 4, p. 500–511, 2014.
- ARAÚJO, A. V. et al. Prostacyclin, not only nitric oxide, is a mediator of the vasorelaxation induced by acetylcholine in aortas from rats submitted to cecal ligation and perforation (CLP). **Vascular Pharmacology**, v. 54, n. 1–2, p. 44–51, 2011.
- BELFIORE, A. et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 586–623, 2009.
- BEUTLER, B. et al. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, v. 232, n. 4753, p. 977–980, 1986.
- BILODEAU, M. S.; LEITER, J. C. Respiratory Physiology & Neurobiology Angiotensin 1-7 in the rostro-ventrolateral medulla increases blood pressure and splanchnic sympathetic nerve activity in anesthetized rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 247, n. October 2017, p. 103–111, 2018.
- BLACK, R. A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. **Nature**, 1997.
- BODOR, C. et al. Angiotensin II increases the permeability and PV-1 expression of endothelial cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 302, n. 1, 2012.
- BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 161–178, 2015.
- BOTELHO, L. M. O. et al. Plasma Angiotensin-(1-7) Immunoreactivity Is Increased by Salt Load, Water Deprivation, and Hemorrhage. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 723–729, 1994.
- BRAVERMAN, J., STANLEY, S. A. Nitric oxide modulates macrophage responses to mycobacterium tuberculosis infection through activation of HIF-1 $\alpha$  and repression of NF- $\kappa$ B. **J Immunol**, v. 199, n. 5, p. 1805–16, 2017.
- BRIONES, A. M. et al. Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 39, n. 3, p. 378–388, 2002.
- BRIONES, A. M.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress and hypertension: Current concepts. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 2, p. 135–142, 2010.
- BUCHER, M. et al. During Sepsis. **Hypertension**, 2001.
- CAO, X. et al. The ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis can inhibit hepatic insulin resistance. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 393, p. 30–38, 2014.

- CASTRO, C. H. DE et al. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 937–942, 2005.
- CATON, P. W. et al. Endotoxin induced hyperlactatemia and hypoglycemia is linked to decreased mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. **Life Sci.** v. 84, n. 21–22, p. 738–744, 2009.
- CAYLA, C. et al. Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 8, p. 1689–1698, 2007.
- CHOWDHURY, P.; SACKS, S. H.; SHEERIN, N. S. Toll-like receptors TLR2 and TLR4 initiate the innate immune response of the renal tubular epithelium to bacterial products. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 2, p. 346–356, 2006.
- CORRÊA, P. B. F. et al. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 183, n. 1–2, p. 17–25, 2007.
- CORRÊA, T. D.; TAKALA, J.; JAKOB, S. M. Angiotensin II in septic shock. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 1–6, 2015.
- DA SILVEIRA, K. D. et al. Anti-Inflammatory Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Receptor, Mas, in Experimental Models of Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5569–5576, 2010.
- DADKHAH, A. et al. Assessing the effect of mentha longifolia essential oils on cox-2 expression in animal model of sepsis induced by caecal ligation and puncture. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 495–504, 2018.
- DELANO, M. J.; WARD, P. A. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 330–353, 2016.
- DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 3, p. 858–873, 2004.
- DHINDSA, S. et al. Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor- $\kappa$ B in mononuclear cells. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 53, n. 3, p. 330–334, 2004.
- DOI, K. et al. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 10, p. 2868–2878, 2009.
- DOMINGUEZ-GUTIERREZ, P. R. et al. Calcium oxalate differentiates human monocytes into inflammatory M1 macrophages. **Front Immunol**, v. 9, p. 1-10, 2018.
- DREWS, G.; KRIPPEIT-DREWS, P.; DÜIFER, M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 460, n. 4, p. 703–718, 2010.
- DUNGAN KM, BRAITHWAITE SS, PREISER JC. Stress hyperglycaemia. **Lancet**, v. 373, n. 9677, p. 1798–807, 2009.
- EHRENTAUT, S. et al. Antagonism of lipopolysaccharide-induced blood pressure

attenuation and vascular contractility. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 10, p. 2170–2176, 2007.

EL-HASHIM, A. Z. et al. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF- $\kappa$ B-dependent pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 6, p. 1964–1976, 2012.

FEINGOLD, K. R. et al. Inflammation inhibits the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver and adipose tissue. **Innate Immun**, v. 18, p. 231-240, 2012.

FERNANDES, L. et al. Role of PGI2 and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. **Regulatory Peptides**, v. 127, n. 1–3, p. 183–189, 2005.

FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 499–507, 2005.

FINFER, S. et al. Hypoglycemia and risk of death in critically ill patients. **N Engl J Med**. v. 367, n. 12, p. 1108–18, 2012.

FÖRSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. **Hypertension**, v. 23, p. 1121–1131, 1994.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 264, n. 3, p. 224–236, 2008.

GAMELLI, R.L. et al. Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice. **J. Leukoc. Biol.** v. 59, p. 639–647, 1996.

GAROFALO, M. A. R. et al. Effect of acute cold exposure on norpinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 60, n. 3, p. 206–208, 12 set. 1996.

GARCIA, J. B. S.; ISSY, A. M.; SAKATA, R. K. Cytokines and Anesthesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 1, p. 86-100, 2002.

GIANI, J. F. et al. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 2, 2009.

HERMANIDES, J. et al. Hypoglycemia is associated with intensive care unit mortality. **Crit Care Med**. v. 38, n. 6, p. 1430–4, 2010.

HÖCHERL, K. et al. Cyclooxygenase-2 Inhibition Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Cardiovascular Failure. **Hypertension**, v. 2, p. 947–953, 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665–668, 1996.

HORTON, R. A.; KNOWLES, R. G.; TITHERADGE, M. A. Endotoxin causes reciprocal changes in hepatic nitric oxide synthesis, gluconeogenesis, and flux through phosphoenolpyruvate carboxykinase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 204, p. 659–665, 1994.

- IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 3, p. 184–195, 2000.
- IGNARRO, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 1, p. 31–36, 1989.
- INOUE, H. et al. Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. **Nat. Med.** v. 10, p. 168–174, 2004.
- JACOB, A. et al. The Inhibitory Effect of Ghrelin on Sepsis Induced Inflammation is Mediated by the MAPK phosphatase-1. **Int J Mol Med**, v. 25, n. 1, p. 159–164, 2010.
- JADHAV, A. P.; SADAKA, F. G. Angiotensin II in septic shock. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 37, n. 6, p. 1169–1174, 2019.
- KATAYAMA, P. L. et al. The carotid body detects circulating tumor necrosis factor- $\alpha$  to activate a sympathetic anti-inflammatory reflex. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 102, p. 370–386, 2022.
- KOO, S.H. et al. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. **Nature**, v. 437, p. 1109–1111, 2005.
- KOTSOVOLIS, G.; KALLARAS, K. The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. **Hippokratia**, v. 14, n. 2, p. 88–93, 2010.
- KRINSLEY, J. S.; GROVER A. Severe hypoglycemia in critically ill patients: risk factors and outcomes. **Crit Care Med.** v. 35, n. 10, p. 2262–7, 2007.
- KUO, C. S. et al. Inhibition of Serine Protease Activity Protects Against High Fat Diet-Induced Inflammation and Insulin Resistance. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- LANG, C.H. et al. Effect of high-dose endotoxin on glucose production and utilization. **Metabolism**, v. 42, p. 1351–1358, 1993.
- LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250–1256, 2003.
- LI, Y. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury by regulating the balance between angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 and inhibiting mitogen-activated protein kinase activation. **Shock**, v. 43, n. 4, p. 395–404, 2015.
- LIN, H. C. et al. Systemic administration of lipopolysaccharide induces release of nitric oxide and glutamate and c-fos expression in the nucleus tractus solitarii of rats. **Hypertension**, v. 33, p. 1218–1224, 1999.
- LIU, L. et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. **Science**, v. 320, n. 5874, p. 379–381, 2008.
- LO, Y. C. et al. Urgosedin inhibits hypotension, hypoglycemia, and pro-inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 44, n. 3, p. 363–371, 2004.
- LUND, D. D. et al. Role of angiotensin II in endothelial dysfunction induced by

lipopolysaccharide in mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 6, 2007.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–350, 1997.

MAHON, J. M. et al. 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, n. 1, p. 199–208, 1995.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: Therapeutic perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 845–852, 2004.

MARCUS, Y. et al. Angiotensin 1-7 as means to prevent the metabolic syndrome lessons from the fructose-fed rat model. **Diabetes**, v. 62, n. 4, p. 1121–1130, 2013.

MARIK, P. E.; RAGHAVAN, M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 748–756, 2004.

MARROCCO, A.; ORTIZ, L. A. Role of metabolic reprogramming in pro-inflammatory cytokine secretion from LPS or silica-activated macrophages. **Front Immunol.**, p. 01-13, 2022.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**. v. 348, n. 16, p. 1546–1554, 2003.

MEDERLE, K. et al. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. **Critical Care**, v. 17, n. 4, p. 1–12, 2013.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY CA JR. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, p. 298–300, 2002.

MENG, Y. et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/mas axis protects against lung fibroblast migration and lung fibrosis by inhibiting the NOX4-derived ROS-mediated RhoA/Rho kinase pathway. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 22, n. 3, p. 241–258, 2015.

MOLINA Y VEDIA, L. et al. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 24929–24932, 1992.

MOLLER, D. E. Potential role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, n. 6, p. 212–217, 2000.

NICOLA, H. The role of contact system in septic shock: The next target? An overview of the current evidence. **Journal of Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 2017.

OFT, M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. **Cancer Immunol Res**, v. 2, n. 3, 2014.

OLIVEIRA, R. C. et al. The pressor effect of angiotensin-(1-7) in the rat rostral ventrolateral medulla involves multiple peripheral mechanisms. **Clinics**, n. 16, p. 245–252, 2013.

- PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191–1195, 2009.
- PASSAGLIA, P. et al. Central angiotensin-(1–7) attenuates systemic inflammation via activation of sympathetic signaling in endotoxemic rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 88, n. October 2019, p. 606–618, 2020.
- PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The Insulin Receptor- A Critical Link In Glucose Homeostasis And Insulin Action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 1999.
- PAUL, M.; MEHR, A. P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 747–803, 2006.
- PAVLOV, V. A.; CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J. Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, p. 783–812, 2018.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press, New York, 2007.
- PILKIS, S.J., GRANNER, D.K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu. Rev. Physiol.** v. 54, p. 885–909, 1992.
- PLUMMER M. P. et al. Dysglycaemia in the critically ill and the interaction of chronic and acute glycaemia with mortality. **Intensive Care Med.** v. 40, n. 7, p. 973–80, 2014.
- SAITO, H. et al. Rapid and simultaneous assay of monoamine neurotransmitters and their metabolites in discrete brain areas of mice by HPLC with coulometric detection. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 42, n. 2, p. 351–356, 1992.
- SALOMAO, R. et al. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. **Shock**, v. 38, n. 3, p. 227–242, 2012.
- SALTIEL, A. R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. **Cell**, v. 104, p. 517–529, 2001.
- SAMPAIO, W. O. et al. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. **Hypertension**, v. 50, p. 1093–1098, 2007.
- SANTOS, G. A. et al. Hypothalamic AMPK activation blocks lipopolysaccharide inhibition of glucose production in mice liver. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 381, p. 88–96, 2013.
- SANTOS, R. A. Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 63, n. 6, p. 1138–1147, 2014.
- SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **PNAS office**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003.
- SANTOS, R. A. S. et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system: Focus on Angiotensin-(1-7). **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 505–553, 2018.
- SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J. Angiotensin-(1–7) and the renin–angiotensin system. **Nephrol Hypertens**, p. 122–128, 2007.
- SANTOS, S. H. et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid

and glycemic metabolism. **Diabetes**, 57(2): p. 340-7, 2008.

SANTUCHI, M. C. et al. Angiotensin-(1-7) and Alamandine promote anti-inflammatory response in macrophages in vitro and in vivo. **Mediators of Inflammation**, v. 19, p. 1-14, 2019.

SCHMAIER, A. H. The contact activation and kallikrein/kinin systems: Pathophysiologic and physiologic activities. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 14, n. 1, p. 28–39, 2016.

SEINO, S.; BELL, G. I. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 159, n. 1, p. 312–316, 1989.

SEYMOUR, C. W. et al. Assessment of clinical criteria for sepsis for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 762–774, 2016.

SHINOZAKI, S. et al. Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 34959–34975, 2011.

SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.

SNYDER, S. H. Nitric oxide and neurons. **Current Biology**, v. 2, n. 7, p. 392, 1992.

SONG, R. et al. Kinetics of IL-6 and TNF- $\alpha$  changes in a canine model of sepsis induced by endotoxin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 146, n. 2, p. 143–149, 2012.

SOUZA, L. L.; COSTA-NETO, C. M. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 5, p. 2117–2122, 2012.

STABILE, A. M. et al. Participation of the inducible nitric oxide synthase on atrial natriuretic peptide plasma concentration during endotoxemic shock. **Regulatory Peptides**, v. 140, n. 3, p. 136–141, 2007.

STABILE, M. A. et al. Central but not systemic inhibition of inducible nitric oxide synthase modulates oxytocin release during endotoxemic shock. **Peptides**, v. 31, p. 706–711, 2010.

SENTANDREU, M. A.; TOLDRA, F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 1–5, 2006.

VACHHARAJANI, V.; MCCALL, C.; Epigenetic and metabolic programming of innate immunity in sepsis. **Innate Immunity**, v. 25, n. 5, p. 267–279, 2019.

VAN CROMPHAUT, S.; VANHOREBEEK, I.; BERGHE, G. Glucose Metabolism and Insulin Resistance in Sepsis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 19, p. 1887–1899, 2008.

VIRDIS, A. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: Role of inducible nitric-oxide synthase

- and oxidative stress. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 945–953, 2005.
- WAESCHLE, R. M. et al. The impact of the severity of sepsis on the risk of hypoglycaemia and glycaemic variability. **Crit. Care**, v. 12, p. 1-11, 2008.
- WALKER, J. M.; WATERBORG, J. H.; MATTHEWS, H. R. The Lowry Method for Protein Quantitation. In: **Basic Protein and Peptide Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2003. p. 1–4.
- WARBURG, O.; GAWEHN, K.; GEISSLER, A. W. Metabolism of leukocytes. **Z Naturforsch B Chem Biochem Biophys Biol**, v. 13B, p. 515–516, 1958.
- WEBER, K. T. Aldosterone in congestive heart failure. **N Engl J Med**. v. 345, p. 1689–1697, 2001.
- WILLIAMS, I. M. et al. Chronic angiotensin-(1-7) improves insulin sensitivity in high-fat fed mice independent of blood pressure. **Hypertension**, v. 67, n. 5, p. 983–991, 2016.
- WONG, G. K. T.; MARSDEN, P. A. Clinical presentation from the Nephrology Dialysis Transplantation Nitric oxide synthases: regulation in disease. **English Journal**, p. 215–220, 1996.
- WU, C. C. et al. Aminoquanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxic shock. **Br J Pharmacol**, v. 114, p. 1666–1672, 1995.
- XIAO, H. et al. Angiotensin-(1-7) prevents lipopolysaccharide-induced hepatocellular inflammatory response by inhibiting the p38MAPK/AP-1 signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, p. 5492-5497, 2018.
- YAMADA, K. et al. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 496–502, 1998.
- YANAY, O. et al. Effects of exendin-4, a glucagon like peptide-1 receptor agonist, on neutrophil count and inflammatory cytokines in a rat model of endotoxemia. **Journal of Inflammation Research**, v. 8, p. 129–135 2015.
- ZARDI, E. M. et al. Prostacyclin in sepsis: A systematic review. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 83, n. 1–2, p. 1–24, 2007.
- ZHANG, F. et al. Antioxidant effect of angiotensin (1-7) in the protection of pancreatic  $\beta$  cell function. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 3, p. 1963–1969, 2016.
- ZHANG, H. et al. Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction. **Clinical Science**, v. 116, n. 3, p. 219–230, 2009.
- ZHU Z. et al. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 40, p. 693–700, 2002.
- ZHUO, J. L.; LI, X. C. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: Focus on intracrine/intracellular angiotensin II. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1551–1565, 2011.