

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) SOBRE O COMPORTAMENTO ANSIOSO EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA**

Sthéfanie Chaves de Almeida Gonçalves

Belo Horizonte

2022

Sthéfanie Chaves de Almeida Gonçalves

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) SOBRE O COMPORTAMENTO ANSIOSO EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia,
Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção
do título de doutora em Fisiologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos

Belo Horizonte

2022

043

Gonçalves, Sthéfanie Chaves de Almeida.

Efeito da angotensina-(1-7) sobre o comportamento ansioso em camundongos submetidos a inflamação pulmonar alérgica [manuscrito] / Sthéfanie Chaves de Almeida Gonçalves. – 2022.

132 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Asma. 3. Inflamação. 4. Angiotensinas. 5. Ansiedade. 6. Depressão. I. Santos, Maria José Campagnole dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE N° 369 DE STHÉFANIE CHAVES DE ALMEIDA GONÇALVES

Às 15:30 horas do dia 19 do mês de dezembro de 2022, transmitida pela plataforma Zoom, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Sthéfanie Chaves de Almeida Gonçalves**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Daniel Campos Villela**, Faculdade de Medicina/Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, **Profa. Dra. Maria da Glória Rodrigues Machado**, Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, **Profa. Dra. Andrea Siqueira Haibara**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Lucas Miranda Kangussu**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Efeito da Angiotensina-(1-7) Sobre O Comportamento Ansioso em Camundongos Submetidos A Inflamação Pulmonar Alérgica**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Campos Villela, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Siqueira Haibara, Professora do Magistério Superior**, em 21/12/2022, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Campagnole dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 28/12/2022, às 03:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria da Glória Rodrigues Machado, Usuário Externo**, em 11/02/2023, às 07:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1970184** e o código CRC **45D1660D**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 369 DE STHÉFANIE CHAVES DE ALMEIDA GONÇALVES

"Efeito da Angiotensina-(1-7) Sobre O Comportamento Ansioso em Camundongos Submetidos A Inflamação Pulmonar Alérgica"

STHÉFANIE CHAVES DE ALMEIDA GONÇALVES

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **19 de dezembro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Daniel Campos Villela, Faculdade de Medicina/UFVJM

Profa. Dra. Maria da Glória Rodrigues Machado, FCMMG

Profa. Dra. Andrea Siqueira Haibara, ICB/UFMG

Prof. Dr. Lucas Miranda Kangussu, ICB/UFMG

Profa. Dra. Maria José Campagnole dos Santos, ICB/UFMG - Orientadora

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 14:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Campos Villela, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Siqueira Haibara, Professora do Magistério Superior**, em 21/12/2022, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Campagnole dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 28/12/2022, às 03:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria da Glória Rodrigues Machado, Usuário Externo**, em 11/02/2023, às 07:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1970204** e o código CRC **23E27BBB**.

Dedico este trabalho à minha família, em especial, a
minha filha, Alice.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me guiar até este momento.

Agradeço a minha família, Alice e Guilherme, por tanto amor, carinho, compreensão e apoio. Por me ajudarem a dividir bem o meu tempo e serem minha companhia até mesmo durante a execução de alguns experimentos.

A minha orientadora, Profa. Maria José por me orientar ao longo dos últimos 6 anos. Por ter contribuído para a minha formação pessoal e acadêmica, sempre com gentileza e compreensão. Você é o exemplo de profissional que eu almejo ser.

Agradeço aos meus pais, Lusimar e Wagner por fazerem sempre o melhor possível.

Aos meus avós João e Elton que se foram durante essa jornada, deixando muita saudade. E as avós Adelina e Carmelita, por compartilharem comigo esse momento.

As minhas irmãs, Karina, Kellen e Tatiana pelo companheirismo.

A toda família Rocha, em especial a minha sogra, Liliane.

A todos os amigos que resistiram ao tempo, a distância e à minha falta de disponibilidade, em especial à minha amiga Kamila, que teve que ouvir as minhas apresentações.

A Juliana que dividiu comigo seus conhecimentos sobre o tema deste trabalho e participou ativamente do primeiro experimento até o último.

A Giselle Magalhães, que foi a responsável estabelecer o protocolo de asma no laboratório e despertar o interesse do assunto desse trabalho, e por sempre ter se feito disponível para ajudar.

A Kamyille, que chegou no meu último ano de doutorado e foi uma grande aquisição para este trabalho e para a minha vida.

A Diana pela prontidão e boa vontade em ajudar, e por dissecar os cérebros dos animais por mim, e ao Lucas pela padronização do método de dosagem de neurotransmissores.

Ao aluno de iniciação Felipe, que chegou em um momento oportuno e me ajudou a executar alguns experimentos mais rápido.

Aos amigos que fiz no laboratório de hipertensão, Filipe Alex, Gabriela Cerri, Mariana Oliveira, Cristiane Amorim, Héric Monteiro, Daniele Alves, Sílvia Zebral, Ana Carolina Lara, Ana Caroline, Júlia e Erick Bryan.

A professora Andrea Haibara, que gentilmente cedeu uma alíquota de anticorpo para que a imunohistoquímica deste trabalho pudesse ser realizada, e sua aluna Silvia Zebral, por ter me dado conselhos valiosos para esse experimento.

As amigas do laboratório de Endocrinologia, em especial a Patrícia e a Paola que me ensinaram a analisar as imagens de c-fos.

A professora Lucíola e sua aluna Marina, pela colaboração nos experimentos de NAG, EPO e MPO.

Aos demais amigos e professores do Laboratório de Hipertensão, Marco Antônio Fontes, Thiago Verano e em especial ao professor Robson Santos.

Aos técnicos Mônica, Alessa e Sílvia, por cuidarem do bem-estar dos animais deste trabalho, e em especial ao técnico André.

A CAPES, FAPEMIG, CNPq, NNC e INCT NanoBioFar pelo apoio financeiro concedido.

“A experiência constantemente molda o cérebro e, nesse sentido, o cérebro é moldado pela experiência”
(Oliver Sacks).

RESUMO

A asma alérgica é uma doença respiratória crônica, até o momento sem cura. Um aspecto que dificulta o controle da asma, é a sua associação com ansiedade e depressão. Essas comorbidades estão presentes em cerca de 50% dos pacientes com asma de difícil controle. A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], um mediador importante do sistema renina-angiotensina, atenua o remodelamento e hiper-reatividade das vias aéreas, além de estimular a resolução do processo inflamatório em modelo de asma crônica. Além disso, a Ang-(1-7) apresenta também efeito ansiolítico/ anti-depressivo quando administrada no sistema nervoso central. O objetivo do presente estudo foi avaliar se parte do efeito benéfico induzido pela Ang-(1-7) para o restabelecimento da homeostasia pulmonar na asma poderia estar relacionado ao comportamento emocional. Foram utilizados camundongos machos das linhagens Balb/c, C57BL/6J e animais *knockout* para o receptor Mas (Mas KO), com 8 a 10 semanas de idade. Os animais foram submetidos ao modelo experimental de asma alérgica e avaliação dos comportamentos do tipo ansioso/depressivo, e parâmetros de inflamação pulmonar. Neste trabalho mostramos que o tratamento de camundongos asmáticos com Ang-(1-7) oral ou intranasal, atenuou o comportamento do tipo ansioso e parâmetros indicativos de inflamação pulmonar. Mostramos ainda, que os efeitos benéficos da Ang-(1-7) administrada periféricamente não foram alterados pela infusão ICV com o antagonista, A-779. Além disso, a infusão ICV com Ang-(1-7), não só preveniu os comportamentos do tipo ansioso e depressivo, como atenuou parcialmente a inflamação pulmonar. Mostramos também que os animais asmáticos com deleção do receptor Mas apresentaram parâmetros inflamatórios atenuados, e ainda sim exibiram comportamentos do tipo ansioso/depressivo. Observamos ainda que o modelo experimental de asma provocou a redução dos níveis de noradrenalina, adrenalina e dopamina nas regiões do córtex e do hipocampo, que não foi modificada pelos tratamentos oral ou intranasal com Ang-(1-7). E por fim, observamos que o tratamento por via oral com Ang-(1-7) preveniu o aumento da atividade neuronal em regiões relacionadas ao controle emocional, como o núcleo paraventricular do hipotálamo e o hipocampo.

Em conjunto, estes resultados indicam que a Ang-(1-7) combina efeitos anti-inflamatórios e ansiolíticos reforçando o interesse no desenvolvimento de novas formulações baseadas em Ang-(1-7) para o tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras chave: Asma, Inflamação, Angiotensina-(1-7), Ansiedade, Depressão

ABSTRACT

Allergic asthma is a chronic respiratory disease without a cure up to this time. One aspect that makes asthma control difficult is its association with anxiety and depression. These comorbidities are present in approximately 50% of patients with difficult-to-control asthma. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], an important mediator of the renin-angiotensin system, attenuates airway remodeling and hyperreactivity, in addition to stimulating the resolution of the inflammatory process in an asthma model chronic. In addition, Ang-(1-7) also has an anxiolytic/antidepressant effect when administered into the central nervous system. The objective of the present study was to evaluate whether part of the beneficial effect induced by Ang-(1-7) for the restoration of pulmonary homeostasis in asthma could be related to an improvement in emotional behavior. Eight to 10 weeks old male Balb/c and C57BL/6J mice strains and Mas receptor knockout animals (Mas KO) were used. Animals were subjected to the experimental model of allergic asthma and to evaluations of anxious/depressive behaviors and lung inflammation parameters. In this work we showed that treatment of asthmatic mice with oral or intranasal Ang-(1-7) attenuated the anxiety- and depression-like behaviors in association to reduction in parameters indicative of pulmonary inflammation. We also showed that the beneficial effects of peripherally administered Ang-(1-7) were not altered by ICV infusion with the Mas antagonist, A-779. Furthermore, ICV infusion with Ang-(1-7) not only prevented anxiety- and depressive-like behaviors, but also partially attenuated lung inflammation. We also showed that asthmatic animals with Mas receptor deletion had attenuated inflammatory parameters, and still exhibited anxious/depressive behaviors. We also observed that the experimental model of asthma caused a reduction in the levels of noradrenaline, adrenaline and dopamine in the regions of the cortex and hippocampus, which was not modified by oral or intranasal treatments with Ang-(1-7). Finally, we observed that oral treatment with Ang-(1-7) prevented the increase in neuronal activity in regions related to emotional control, such as the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the hippocampus. Taken together, these results indicate that Ang-(1-7) combines anti-inflammatory and anxiolytic and anti-depressive

effects, reinforcing the interest in the development of new formulations based on Ang-(1-7) for the treatment of inflammatory diseases.

Keywords: Asthma, Inflammation, Angiotensin-(1-7), Anxiety, Depression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão simplificada do Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	24
Figura 2. Visão simplificada da fisiopatologia da asma alérgica	26
Figura 3. Resumo gráfico: inflamação e comportamento emocional.....	35
Figura 4. Protocolo de modelo animal de asma alérgica e tratamentos com Ang-(1-7) por duas diferentes vias periféricas (oral 60µg/kg e intranasal 30µg/kg).....	45
Figura 5. Protocolo de indução de asma alérgica e cirurgia estereotáxica para implantar minibomba osmótica via ICV (Ang-1-7 ou A-779) em camundongos submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.	46
Figura 6. Imagem ilustrativa do teste em campo aberto.....	47
Figura 7. Imagem ilustrativa do teste de suspensão pela cauda	48
Figura 8. Protocolo de sensibilização para modelo de asma alérgica e perfusão cardíaca para imunohistoquímica.....	52
Figura 9. Tempos de tratamento e desafio para os grupos experimentais: Ang-(1-7) via oral, asmático e controle.....	52
Figura 10. Contagem diferencial de células do fluido do lavado bronco-alveolar (LBA).	56
Figura 11. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. .	57
Figura 12. Imagens representativas de cortes do pulmão.....	59
Figura 13. Determinação do infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica.	60
Figura 14. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda.....	61
Figura 15. Contagem diferencial de células do fluido do lavado bronco-alveolar (LBA).	62
Figura 16. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. ...	63
Figura 17. Imagens representativas de cortes de pulmão.	64
Figura 18. Infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica.	65
Figura 19. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda.....	66
Figura 20. Peso dos animais submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.....	67
Figure 21. Contagem de células no fluido do lavado bronco-alveolar.....	68
Figura 22. Concentração das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO, A), mieloperoxidase (MPO, B) e N-acetilglucosaminidase (NAG, C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica....	69
Figura 23. Cortes histológicos do pulmão de animais submetidos ao protocolo experimental de asma....	70
Figura 24. Determinação do infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica.	70
Figura 25. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda.....	71
Figura 26. Peso dos animais selvagens e nocautes submetidos ao modelo experimental de asma alérgica	72
Figura 27. Contagem diferencial de células no fluido do lavado bronco-alveolar.....	73
Figura 28. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica..	74
Figura 29. Imagens representativas de cortes do pulmão.	75
Figura 30. Infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica..	76
Figura 31. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda.	77
Figura 32. Peso dos animais submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.....	77
Figura 33. Contagem diferencial de células do fluido do lavado bronco-alveolar (LBA)..	78
Figura 34. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. .	79
Figura 35. Cortes histológicos do pulmão de animais submetidos ao protocolo experimental de asma....	80

Figura 36. Quantificação do infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica.	81
Figura 37. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda.....	82
Figura 38. Contagem diferencial de células do fluido do lavado bronco-alveolar (LBA).	83
Figura 39. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. ...	84
Figura 40. Cortes histológicos do pulmão de animais submetidos ao protocolo experimental de asma...	85
Figura 41. Infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica	86
Figura 42. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda.....	87
Figura 43. Peso dos animais submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.....	88
Figura 44. Dosagem de neurotransmissores no córtex pré-frontal de animais submetidos a modelo experimental de asma alérgica	91
Figura 45. Dosagem de neurotransmissores no hipocampo de animais submetidos a modelo experimental de asma alérgica	92
Figura 46. Dosagem de neurotransmissores no estriado de animais submetidos a modelo experimental de asma alérgica	93
Figura 47. Dosagem de neurotransmissores na região da amígdala de animais submetidos a modelo experimental de asma alérgica	94
Figura 48. Diagrama de corte frontal do cérebro de camundongo do atlas de Paxinos e Watson (2002)..	95
Figura 49. Imagens representativas do PVN.	96
Figura 50. Marcação de c-Fos no PVN	97
Figura 51. Imagens representativas do hipocampo	98
Figura 52. Marcação de c-Fos no hipocampo.	99
Figura 53. Resumo gráfico dos resultados.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros inflamatórios e de comportamento de animais asmáticos tratados ou não tratados.....89

Tabela 2. Níveis de neurotransmissores e atividade de c-Fos em diferentes áreas do cérebro de camundongos submetidos ao modelo de asma tratados com Ang-(1-7)100

ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina - Serotonina
A-779	Antagonista Seletivo da Ang-(1-7)
ACTH	Adrenocorticotropina
AD	Adrenalina
Ang	Angiotensina
ANOVA	Análise de Variância
AT ₁	Receptor de Angiotensina do Tipo 1
AT ₂	Receptor de Angiotensina do Tipo 2
AVE0991	Agonista Não-Peptídico do Receptor Mas
BHE	Barreira Hematoencefálica
BLA	Amígdala Basolateral
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CeA	Núcleo Central da Amígdala
Cebio	Centro de Bioterismo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CRF	Fator Liberador de Corticotropina
DA	Dopamina
DMN	Núcleo Motor Dorsal do Vago
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EPO	Peroxidase Eosinofílica
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GINA	Iniciativa Global para Asma
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HPβCD	Hidroxiopropil-ciclodextrina
i.p.	Intraperitoneal
ICV	Intracerebroventricular
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
Mas	Receptor de Angiotensina-(1-7)
MPO	Mieloperoxidase

NA	Núcleo Ambíguo
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N-acetilglucosaminidase
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Noradrenalina
NEP	Endopeptidase Neutra
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OVA	Ovalbumina
PA	Pressão Arterial
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salina
PEP	Protil-endopeptidase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RVLM	Área Rostroventrolateral do Bulbo
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TLR-4	Receptor do Tipo Toll 4
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	22
1.1.	Sistema renina angiotensina	22
1.2.	Fisiopatologia da asma	24
1.3.	O sistema renina-angiotensina e asma.....	27
1.4.	Inflamação e comportamento emocional.....	28
1.5.	Asma e alteração no comportamento emocional.....	36
1.6.	O SRA e alteração de comportamento emocional.....	39
2.	OBJETIVO	41
3.	ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS:	42
	Protocolo 1	42
	Protocolo 2	42
	Protocolo 3	42
	Protocolo 4	43
	Protocolo 5	43
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1.	Animais	44
4.2.	Indução de inflamação pulmonar alérgica.....	44
4.3.	Administração de Ang-(1-7) ou do antagonista do receptor Mas	45
4.4.	Canulação do ventrículo lateral.....	46
4.5.	Teste em campo aberto.....	46
4.6.	Teste de suspensão pela cauda	47
4.7.	Coleta de sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e pulmão.....	48
4.8.	Contagem de leucócitos totais	49
4.9.	Contagem diferencial de leucócitos.....	49
4.10.	Determinação do grau de infiltrado inflamatório no pulmão	49
4.10.1.	Método Histológico.....	49
4.10.2.	Método enzimático para detecção da presença de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos.....	50
4.11.	Imunohistoquímica para c-Fos	51
4.11.1.	Modelo experimental.....	51
4.11.2.	Coleta do cérebro.....	52
4.11.3.	Imunohistoquímica.....	53
4.12.	Dosagem de neurotransmissores em áreas do SNC.....	54
4.13.	Dosagem de proteína	54
4.14.	Análise estatística	55
5.	RESULTADOS	56

5.1.1. Tratamento com Ang-(1-7) via oral.	56
5.1.2. Tratamento com Ang-(1-7) via intranasal.	62
5.2. Efeito do comportamento do tipo ansioso e inflamação pulmonar em animais com deleção do receptor Mas submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.....	67
5.3. Efeito do tratamento ICV com Ang-(1-7) sobre inflamação pulmonar e comportamento do tipo ansioso em animais submetidos modelo de asma.....	72
5.4. Efeito do tratamento ICV com A-779, antagonista seletivo da Ang-(1-7), sobre inflamação pulmonar e comportamento do tipo ansioso de animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral ou intranasal.	78
5.4.1. Tratamento com Ang-(1-7) via oral e A-779 ICV.....	78
5.4.2. Tratamento com Ang-(1-7) via intranasal e A-779 ICV.	83
5.5. Dosagem de neurotransmissores em áreas do SNC relacionadas ao comportamento emocional de animais submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.	90
5.5.1. Dosagem de neurotransmissores no córtex pré-frontal	90
5.5.2. Dosagem de neurotransmissores no hipocampo.....	91
5.5.3. Dosagem de neurotransmissores no estriado.....	92
5.5.4. Dosagem de neurotransmissores na região da amígdala	93
5.6. Efeito do tratamento periférico com Ang-(1-7) sobre expressão de c-Fos em áreas cerebrais de animais submetidos modelo de asma	94
6. DISCUSSÃO.....	101
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E ETAPAS FUTURAS.....	112
8. SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	113
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
10. ANEXOS.....	130

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema renina angiotensina

O Sistema renina angiotensina (SRA), é um sistema endócrino fundamental para o controle da pressão arterial (PA) e balanço hidroeletrólítico (HALL, 1991). A renina, um dos componentes desse sistema, é uma enzima circulante, liberada pelas células justaglomerulares dos rins (WILKINSON-BERKA, 2008). Esta enzima é liberada em resposta a estímulos como PA baixa, baixo teor de sódio e atividade do sistema nervoso simpático [ativação do adrenoreceptor beta-1](MANRIQUE *et al.*, 2009). A renina é responsável por hidrolisar o angiotensinogênio (globulina secretada pelo fígado) em angiotensina I (Ang I; Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸-His⁹-Leu¹⁰) (HUANG *et al.*, 2006).

O principal produto deste sistema é o octapeptídeo angiotensina II (Ang II; Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷-Phe⁸), majoritariamente formado a partir da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) sobre a Ang I (SANTOS, *et al.*, 2005). São removidos dois aminoácidos C terminais da Ang I para formar a Ang II, além da ação da ECA, a Ang II também pode ser formada por ação de outras enzimas como a e quimase, tonina e catepsina D, por exemplo (BELOVA, 2000).

O eixo circulante principal do SRA é representado pela enzima conversora de angiotensina, Ang II e receptor AT₁. O eixo Ang II/AT₁ tem ação vasoativa em todos os vasos sanguíneos (artérias e veias), pois contrai a musculatura lisa, aumentando a pressão arterial e a frequência cardíaca. Além do papel na PA, a Ang II é uma molécula versátil que está presente em quase todos os sistemas, participando de processos fisiopatológicos como ansiedade, depressão, disfunção endotelial, aterosclerose, inflamação e doenças pulmonares (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2016; BILD; CIOBICA, 2013, GEISTERFER *et al.*, 1988, MILLAR *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 2000, PEACH e DOSTAL., 1990, YVAN-CHARVET e QUIGNARD-BOULANGE., 2011).

A Ang II, também apresenta ações via receptor AT₂, no entanto são menos conhecidas, o que pode ser explicado pela sua menor expressão quando comparado com o receptor AT₁. Além dessa diferença de expressão, na maior parte das vezes as ações da Ang II via AT₂ são antagônicas às produzidas pela Ang II via receptor AT₁ (SCHEUER e PERRONE, 1993). Muitos outros peptídeos do SRA já foram descritos, como a Ang III, Ang IV, Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (SANTOS *et al.*, 2000), Angiotensina-(1-9) (DONOGHUE *et al.*, 2000) e Alamandina (LAUTNER *et al.*, 2013).

A Ang-(1-7) (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷) é um heptapeptídeo, predominantemente formado através da ação da ECA2 e tem seus efeitos fisiológicos mediados pelo receptor Mas, um receptor acoplado a proteína G, identificado como sítio de ligação para Ang-(1-7) (SANTOS, *et al.*, 2003, 2005). A ECA2 participa da formação de Ang-(1-7) de duas maneiras, primeiro agindo diretamente na Ang II clivando a fenilalanina, e por consequência formando a Ang-(1-7) ou através da clivagem do aminoácido leucina da porção C-terminal da Ang I, formando a Ang-(1-9) (RICE *et al.*, 2004; OCARANZA *et al.*, 2006), que por sua vez pode ser convertida pela ECA, por endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP), também resultando em Ang-(1-7) (SANTOS, 2014). Além disso, Ang-(1-7) pode ser formada diretamente a partir de Ang I por PEP e NEP (VICKERS *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005; ETELVINO *et al.*, 2014).

Alguns efeitos apresentados pela Ang-(1-7) incluem ações anti-inflamatória, anti-fibrótica, anti-hipertensiva, anti-proliferativa, anti-aritmogênica, anti-angiogênica, antitrombótica, antioxidante e vasodilatadora, além de apresentar efeito na memória e aprendizado (FERREIRA, A. J.; SANTOS; ALMEIDA, 2001; HELLNER *et al.*, 2005; LAZARONI *et al.*, 2012; RODRIGUES-MACHADO *et al.*, 2013; SANTOS, 2014; YANG *et al.*, 2011). Assim o eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ Mas apresenta, a maioria das ações, opostas às da Ang II. A figura 1 representa a visão simplificada do SRA.

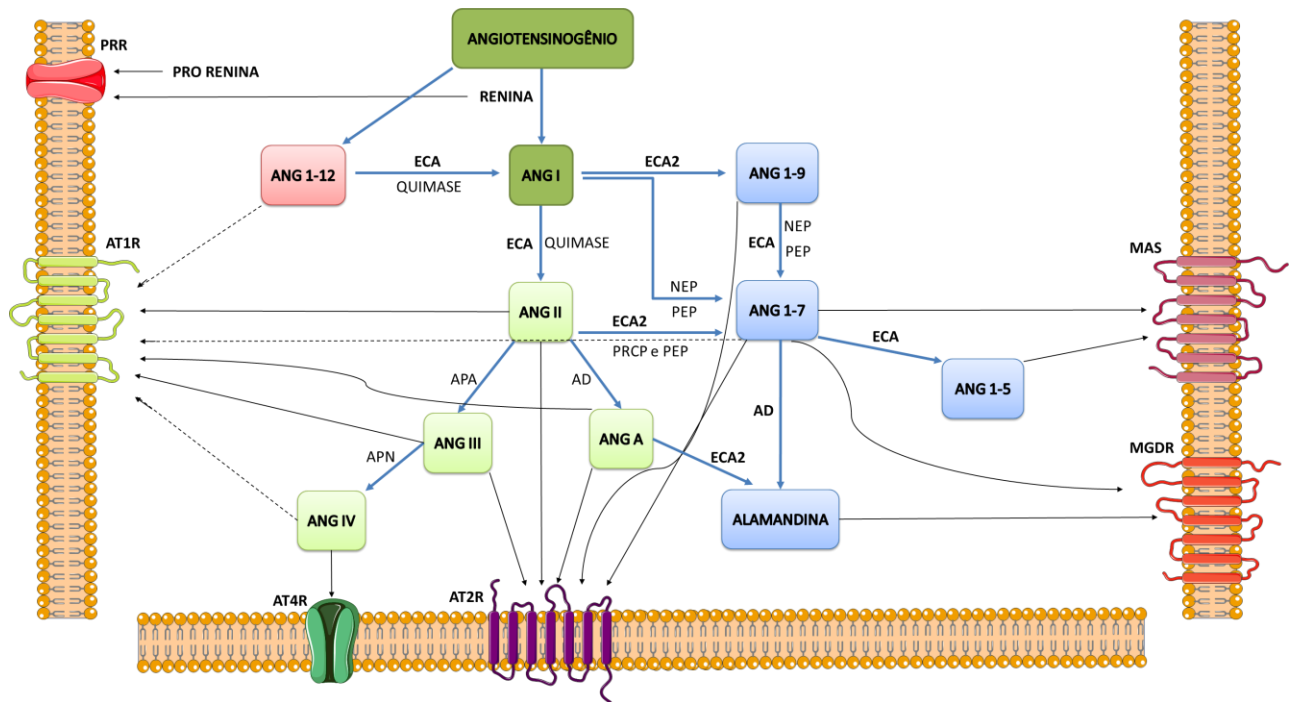


Figura 1. Visão simplificada do Sistema Renina-Angiotensina (SRA). O SRA é iniciado pela renina, que é secretada pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais em resposta à diminuição da perfusão, em resposta a baixos níveis de sódio, após estimulação do receptor β 1-adrenérgico ou após estimulação por óxido nítrico ou prostaglandina. O precursor da renina pro-renina e a renina se ligam ao receptor da pro-renina (PRR). Na circulação, a renina cliva o angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). A Ang I também pode ser gerada pela clivagem da Ang 1–12 pela enzima conversora de angiotensina (ECA) ou pela quimase no tecido cardíaco. A cascata proteolítica resultante pode ser dividida em vias canônicas e não canônicas. A via canônica é iniciada quando a ECA, ou quimase no coração, cliva Ang I em Ang II. A ligação da Ang II ou de seus produtos de clivagem Ang III ou Ang A ao receptor acoplado à proteína G Ang II tipo 1 (AT1R) leva à vasoconstrição, aumento da pressão arterial e outros efeitos. A via não canônica é iniciada pela clivagem de Ang I por ACE2 em Ang 1–9, que é posteriormente clivada em Ang 1–7 (principalmente por ECA). Na via não canônica, a ligação de Ang II, Ang III, Ang 1–9, Ang 1–7 e Ang A ao AT2R neutraliza os efeitos mediados pelo AT1R. A Ang IV (gerada a partir da Ang III quando clivada pela aminopeptidase N (APN)) está envolvida tanto na via canônica quanto na via não canônica e se liga ao receptor da angiotensina 4 (AT4R), também conhecido como aminopeptidase regulada por insulina. A ligação da Ang IV ao AT4R tem efeitos antiapoptóticos e pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, pois regula as respostas por inibição competitiva da enzima/receptor. A Ang 1–7 se liga aos receptores MAS e ao receptor acoplado à proteína G (MRGD) relacionado a MAS, e a alamandina, que é gerada a partir de Ang A ou Ang 1–7, também se liga ao MRGD. Tanto Ang 1–7 quanto alamandina têm efeitos anti-hipertensivos, anti-inflamatórios e antifibróticos. As vias RAS não canônicas e canônicas podem se contrabalançar. Por exemplo, Ang II liga-se a AT2R (via não canônica) e AT1R (via canônica), mas exerce um efeito mais robusto em AT1R. AT2R pode, no entanto, ser regulado positivamente durante condições patológicas (BEKASSY *et al.*, 2022).

1.2. Fisiopatologia da asma

A asma é uma doença heterogênea caracterizada por hiperresponsividade brônquica, remodelamento das vias aéreas, limitação do fluxo de ar, inflamação crônica e aumento da produção de imunoglobulina E (IgE) (MUCIDA *et al.*, 2003). É considerada um problema

mundial de saúde pública, acometendo cerca de 300 milhões de indivíduos ao redor do mundo. É estimado que existam 20 milhões de asmáticos no Brasil, anualmente ocorrem aproximadamente 350.000 internações por asma, sendo a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2022).

A fisiopatologia da asma é resultado de complexas interações entre alérgeno, mediadores inflamatórios e células estruturais das vias aéreas (Figura 2). A resposta inflamatória alérgica é iniciada pelo contato com alérgenos ambientais (ácaros, pêlos de animais, fungos, pólen, poluição do ar) com células apresentadoras de antígeno, que tem como função apresentar o alérgeno ao sistema imunológico. Ao entrarem em contato com os alérgenos os linfócitos T *naive* (indiferenciados) diferenciam-se em linfócitos Th2 e produzem citocinas importantes para o início e manutenção do processo inflamatório, tais como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, TNF- α e quimiocinas como CCL2 e CCL5 (FINKELMAN *et al.*, 2010; HIDEAKI YAMAMOTO; SEDGWICK JB; BUSSE WW., 1998; LASSALLE *et al.*, 1993; WHITTAKER *et al.*, 2002). Por meio da produção de IL-4 e IL-13, o linfócito T auxiliar faz com que os linfócitos B sejam estimulados a se diferenciarem em plasmócitos produtores de IgE específica ao alérgeno sensibilizante. Ao ser liberada na corrente sanguínea, a IgE se liga a receptores de alta afinidade na membrana celular de mastócitos, basófilos e eosinófilos. Ao segundo contato com o alérgeno, este se liga à membrana celular dos mastócitos, basófilos e eosinófilos, através de uma relação antígeno-anticorpo, provocando a degranulação destas células. Em consequência ocorre a liberação de histaminas, serotonina, leucotrienos e prostaglandinas, que desencadeiam a ativação e recrutamento de células inflamatórias para o tecido pulmonar (HOLGATE; FINNERTY, 1988; MUCIDA *et al.*, 2003).

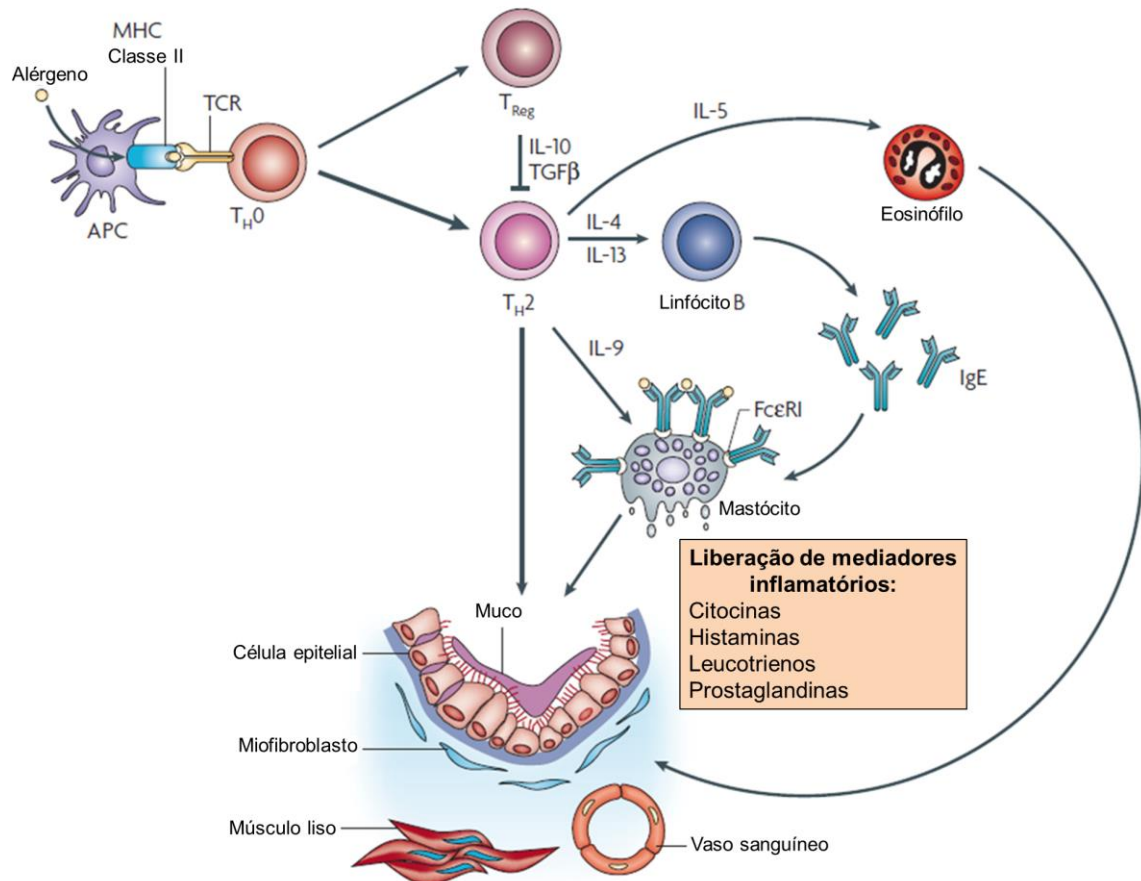


Figura 2. Visão simplificada da fisiopatologia da asma alérgica (Adaptado de Holgate e Polosa., 2008).

A patogênese da asma associa-se a mecanismos moleculares e celulares da inflamação alérgica pulmonar. Em indivíduos predispostos, a exposição inicial de células apresentadoras de antígenos (APC) ao alérgeno leva principalmente à ativação de células T auxiliares 2 (TH2) específicas do alérgeno e à síntese de IgE, que é conhecida como sensibilização alérgica. Exposições subsequentes ao alérgeno causam recrutamento e ativação de células inflamatórias e liberação de mediadores, que são responsáveis por respostas alérgicas precoces (agudas) e respostas alérgicas tardias. Na resposta alérgica inicial, minutos após o contato com o alérgeno, os mastócitos sensibilizados por IgE degranulam, liberando mediadores pré-formados e recém-sintetizados. Estes incluem histamina, leucotrienos e citocinas, que promovem a permeabilidade vascular, a contração do músculo liso e a produção de muco. Os eosinófilos liberam um grande número de mediadores pró-inflamatórios e podem ser uma fonte importante de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-3 (IL-3), IL-5 e IL-13 (Holgate e Polosa., 2008).

A limitação do fluxo de ar, característica da asma, é causada por fatores como a inflamação, o excesso de secreção mucosa e remodelamento (espessamento da parede das vias aéreas), além da broncoconstrição em resposta ao estímulo alérgico (WENZEL, 2012). Os medicamentos padronizados para aliviar os sintomas da crise, geralmente são β₂ agonistas, de curta ação inalatória, corticosteroides e/ou brometo de ipratrópio (WENZEL, 2012). No entanto, quando há

obstrução das vias respiratórias por muco e broncoconstrição, reduzindo ainda mais o diâmetro das vias aéreas, o sítio de ação fica limitado e os medicamentos podem não corresponder a demanda. É por esse motivo que a asma pode gerar hospitalização e até mesmo morte súbita (JENDZJOWSKY *et al.*, 2018; WENZEL, 2012).

1.3. O sistema renina-angiotensina e asma

Estudos recentes avançaram nossa compreensão sobre as ações do SRA na fisiopatologia da asma. A Ang II, pode ser produzida localmente nos pulmões e apresenta um efeito direto sobre as células musculares lisa das vias aéreas, potencializando a responsividade das vias aéreas, e contribuindo para broncoconstrição característica da crise asmática (MARSHALL *et al.*, 2004; MILLAR; NALLY; THOMSON, 1995; PHILLIPS *et al.*, 1993). Além disso, o eixo Ang II/AT₁ apresenta ações pró-inflamatórias, estimulando a produção de moléculas como a interleucina-1 beta (IL-1 β), aumentando a produção de prostaglandinas e expressão de receptor do tipo toll 4 (TLR-4), que iniciam a resposta inflamatória e estresse oxidativo, além de exercer seus principais efeitos cardiovasculares como vasoconstrição (CATT *et al.*, 1984; JI *et al.*, 2009). Por outro lado, o bloqueio do receptor AT₁, é capaz de atenuar a inflamação e a hiperresponsividade das vias aéreas (MYOU *et al.*, 2002).

O eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas ganhou muito interesse nos últimos anos devido as ações anti-inflamatória, anti-proliferativa e anti-fibrótica, que se opõem aos conhecidos efeitos pró-inflamatórios do eixo ECA/AngII/receptor AT₁ (GREGÓRIO *et al.*, 2021; ZAIDAN *et al.*, 2022). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a administração de Ang-(1-7) ou um análogo sintético do receptor Mas, AVE0991, atenuaram significativamente a inflamação e o remodelamento pulmonar, além de melhorar a função pulmonar em um modelo experimental de asma crônica (MAGALHÃES *et al.*, 2015, 2016, 2020, 2021; RODRIGUES-MACHADO *et al.*, 2013). A evidência de que o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas modula a inflamação foi corroborada em outros modelos experimentais, incluindo acidente vascular cerebral isquêmico (BENNION *et al.*,

2015; REGENHARDT; BENNION; SUMNERS, 2014), aterosclerose (LI *et al.*, 2016), fibrose pulmonar (SHENOY *et al.*, 2010), lesão pulmonar aguda (KEHOE *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2016), enfisema pulmonar (BASTOS *et al.*, 2020), artrite (BARROSO *et al.*, 2017; DA SILVEIRA *et al.*, 2010), lesão renal e nefropatia diabética (BARROSO *et al.*, 2012; BERTONCELLO *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2013). Mostramos também que a inflamação pulmonar alérgica foi agravada em camundongos com deleção genética do receptor Mas (MAGALHÃES. *et al.*, 2016), sugerindo que a resolução da inflamação pode ser alterada na ausência ou mal funcionamento do eixo ECA2/Ang- (1-7) /Mas. Mais importante, estudos de nosso laboratório mostraram que a Ang-(1-7) promove a resolução da inflamação pulmonar alérgica (MAGALHÃES *et al.*, 2018), na artrite (BARROSO *et al.*, 2017) e na pleurisia e peritonite (ZAIDAN *et al.*, 2022).

1.4. Inflamação e comportamento emocional

As emoções podem ser definidas como um conjunto de funções centrais inter-relacionadas, decorrentes de estados de recompensa e punição (LEDOUX., 1987, ROLOS., 2001). A exposição a eventos traumáticos e/ou estressantes, inclusive os estímulos que induzem medo e ansiedade, resultam na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e por consequência dessa ativação, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (HAROON; RAISON; MILLER, 2012). A resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC), promove efeitos comportamentais, como reação temporária e controlada. No entanto, quando essa inflamação torna-se crônica, pode influenciar a excitabilidade neuronal, a liberação neurotransmissores, a expressão de receptores e transportadores através de hormônios periféricos e respostas autonômicas, levando ao desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas (MICHPOULOS *et al.*, 2017; SALIM; CHUGH; ASGHAR, 2012). Uma informação que auxilia a compreensão do papel das citocinas em doenças psiquiátricas, é que as citocinas podem modular a atividade neuronal em regiões específicas do cérebro, como amígdala, hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal, que não por coincidência, são as regiões envolvidas no controle emocional

(BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; ELENKOV *et al.*, 2000).

A inflamação periférica pode modular também a expressão de citocinas no SNC. Estudos já mostraram que citocinas periféricas como IL-1 β , IL-1 α , IL-6 e TNF- α podem permear o cérebro através de transporte ativo mediado por transportadores saturáveis, e ativar células gliais em órgãos circunventriculares, meninges e plexo coroide induzindo a produção de mais citocinas pró-inflamatórias no SNC (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002; DANTZER *et al.*, 2008).

Além disso, a informação de inflamação periférica na asma também pode chegar ao SNC via aferência vagal ou por ativação do corpo carotídeo (quimiorreceptor sensível a alterações de oxigênio no sangue). O corpo carotídeo é inervado pelos nervos vago e glossofaríngeo, e modula respostas reflexas para regular a frequência cardíaca, a pressão sanguínea, intensidade e frequência respiratória (BARNES; 1986; UNDEM; CARR 2002; DENJEAN, 1991; MOORE; 2001). Ainda, os neurônios sensoriais do pulmão detectam e transmitem a presença de estímulos nociceptivos (como alérgenos) para o SNC, são eles os responsáveis pelo reflexo de tosse e pela modulação da inflamação periférica pulmonar (BARNES, 1986; GEPETTI *et al.*, 2010; VASKO, 2002). Esse efeito parece ser mediado por aferência vagal, uma vez que o nervo vago inclui neurônios sensoriais que inervam a maioria dos órgãos internos, e também pode expressar receptores de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, a IL-1. Ademais, o efeito do alérgeno sobre o pulmão asmático também envolve o tronco encefálico, dado que a vagotomia é capaz de inibir a broncoconstrição em modelo experimental de asma (TRÄNKNER *et al.*, 2014).

Uma vez que os sinais de citocinas atingem o cérebro, existe uma rica rede em astrócitos, micróglia e neurônios, que produzem e expressam receptores de citocinas. Esses mediadores inflamatórios são responsáveis por mediar a comunicação entre o sistema imunológico e o cérebro, e parecem coordenar a resposta celular aos desafios imunológicos e permitir mudanças comportamentais necessárias para recuperação (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Na verdade, a ativação da micróglia resulta em uma dualidade de eventos, um estado de ativação clássico, que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1, IL-6, espécies

reativas de oxigênio e óxido nítrico, que exacerbam o estado inflamatório, e por outro lado, exerce um estado de inflamação alternativo, direcionado para a função anti-inflamatória. Estes sinais podem ainda ativar seus receptores e desencadear uma cascata inflamatória, amplificando o sinal inflamatório periférico e exercendo o efeito central das citocinas, que podem afetar os sistemas neuroimune, neuroendócrino e comportamento (VOISIN; BOUVIER; CHIU, 2017). Estudos clínicos e em animais, mostraram que a inflamação periférica também pode interromper a função normal da barreira hematoencefálica (BHE) por meio de várias vias, levando a lesões secundárias respostas inflamatórias no SNC e desenvolvimento de doenças neurológicas (GALEA, 2021).

O equilíbrio entre esses estados regula várias funções no SNC, como a manutenção da neuroplasticidade, no entanto, o excessivo estado pró-inflamatório interrompe múltiplas funções neuronais, incluindo sinalização prejudicada de neurotransmissores e o bloqueio da síntese, recaptação e liberação de neurotransmissores (STEPHAN; BARRES; STEVENS, 2012). Dessa forma, resultam na disfunção dos circuitos neuronais que envolvem emoção e cognição (DANTZER *et al.*, 2008).

A ansiedade é descrita como um sentimento que causa preocupação, medo, nervosismo e sofrimento antecipado. É uma reação fisiológica, frente à uma situação específica, que desperta um sistema de alarme (GRAY, 1982). De acordo com Rosen e Schulkin (1998), a ansiedade normal é identificada por respostas adaptáveis, que surgem frente a uma situação de perigo, permitindo aos indivíduos dar a respostas mais adequadas (ROSEN; SCHULKIN, 1998). Por outro lado, a ansiedade patológica, é expressa de forma exagerada, pela hiperexcitabilidade, hipervigilância e aumento da responsividade comportamental. Reações desproporcionais persistentes, associadas a prejuízos sociais e ocupacionais (CRASKE; STEIN, 2016). É, portanto, a intensidade que diferencia o estado de ansiedade normal e patológico.

Tanto a ansiedade normal, quanto a patológica, são compostas por três elementos: resposta fisiológica, cognitiva e motora, que podem compreender um grande número de reações (BARLOW, 1988). A princípio, a resposta fisiológica da ansiedade inclui uma forte ativação do

sistema nervoso autônomo, que se manifesta como queixas físicas e comportamentos, relacionados a pensamentos e sentimentos do indivíduo. Assim, cognitivamente, a ansiedade pode apresentar distorções do estado de segurança, receio e apreensão. Juntamente com a resposta motora, que é caracterizada por comportamentos de esquiva, inquietação ou até mesmo imobilidade (BARLOW, 1988).

Apesar da literatura ser vasta, o mecanismo fisiopatológico da ansiedade e de outros transtornos psíquicos relacionados, ainda não está bem esclarecido. Em uma revisão sobre a inflamação nos transtornos de medo e ansiedade, Michopoulos *et al.* (2017), discutem que os achados sobre o papel das citocinas pró-inflamatórias periféricas são de certa forma contraditórios. Por exemplo, enquanto alguns estudos observaram o aumento de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em transtornos relacionados a ansiedade (BRAMBILLA *et al.*, 1994; HOGE *et al.*, 2009; VIEIRA, M. M. M. *et al.*, 2010), outros estudos não encontraram alterações dessas mesmas citocinas circulantes (WAGNER *et al.*, 2015; VOGELZANGS *et al.*, 2013). No entanto, Boscarino e Chang, (1999) observaram que pacientes com transtornos de ansiedade tinham contagens de linfócitos e células T acima da faixa média, bem como linfócitos de células T altamente sensibilizados, mesmo 20 anos após a exposição traumática. Neste mesmo estudo também foi observado o aumento de proteína C reativa sérica, uma proteína sintetizada no fígado em resposta a inflamação (BOSCARINO; CHANG, 1999), indicando o papel importante da inflamação periférica na gênese das doenças emocionais. Assim como o observado em estudos utilizando modelo animal. Por exemplo, a elevação da expressão periférica de citocinas foi associada ao aumento de comportamento do tipo ansioso em camundongos (ŠAKIĆ *et al.*, 1994; SCHROTT; CRNIC, 1996). Em resposta a estímulos estressores, o eixo HPA tem a função de secretar glicocorticoides afim de prevenir o estado inflamatório. No entanto, quando a ação dos glicocorticoides é inibida, contribui ainda mais para o estado pró-inflamatório do SNC, que pode influenciar os sistemas de neurotransmissores, neurocircuitos e, contribuir para a manutenção dos sintomas de medo e ansiedade.

A depressão e a ansiedade parecem ser processos inter-relacionados, uma vez que o estresse está implicado na etiologia tanto da ansiedade quanto da depressão ou é consequência delas (ANISMAN; ZACHARKO, 1982). A comorbidade do transtorno de ansiedade e a depressão é muito alta, com 74% dos pacientes deprimidos apresentando sintomas de ansiedade, enquanto 61% dos pacientes ansiosos apresentam sintomas de depressão (ALMEIDA_FILHO *et al.*, 2007).

A patogênese da depressão está relacionada a diferentes tipos de transtornos mentais, compartilhando algumas alterações biológicas (BELMAKER; AGAM, 2008). Nas últimas décadas, evidências apontaram a disfunção da transmissão monoaminérgica, como a hipótese mais prevalente na fisiopatologia da depressão/ ansiedade, devido a redução das concentrações de serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DA) (DELGADO, 2000; HINDMARCH, 2001; SULSER; WATTS; BRODIE, 1962). Uma das evidências do envolvimento da noradrenalina, em transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão, é que as regiões do hipocampo, amígdala, PAG, córtex, hipotálamo e essencialmente todas as regiões corticolímbicas envolvidas na integração da resposta à ansiedade, são fortemente inervadas por projeções noradrenérgicas (ASTON-JONES; CHIANG; ALEXINSKY, 1991; LINDVALL; BJÖRKLUND; SKAGERBERG 1984; SCHATZBERG *et al.*, 1981). A serotonina, por sua vez, é frequentemente apontada como o principal neurotransmissor envolvido na fisiopatologia da ansiedade, dessa forma, os inibidores seletivos de recaptção de serotonina, inibidores seletivos de recaptção de serotonina e noradrenalina e benzodiazepínicos, por exemplo, são considerados medicamentos benéficos para combater transtornos de ansiedade (TYRER; BALDWIN, 2006). No entanto, alguns estudos mostraram que a depleção de triptofano, precursor da serotonina, não induziram ansiedade (GRAEFF, 1997; MILLER; DEAKIN; ANDERSON, 2000). A 5-HT tem um papel um tanto controverso, Deakin e Graeff, (1991) propuseram que a serotonina exerceria dois papéis nos estados de ansiedade, um papel na modulação de respostas defensivas com um importante sentido adaptativo. Desse modo, foi postulado que sinais de perigo estimulariam o sistema de defesa através da amígdala e ativariam neurônios serotoninérgicos situados nos núcleos dorsais da rafe,

que por sua vez inervam a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal. Desse modo, o aumento de serotonina na amígdala produziria um efeito ansiogênico e na substância cinzenta periaquedutal dorsal, ansiolítico (DEAKIN; GRAEFF, 1991). Além disso, outros estudos apontaram para alterações na transmissão de transmissores GABAérgicos e/ou glutamatérgicos, alterações de citocinas e esteróides e desregulação do ritmo circadiano (ANTONIJEVIC, 2006; RESSLER; NEMEROFF, 2000; NUTT *et al.*, 2002).

O estresse, a ansiedade e a depressão tem efeitos parecidos no eixo HPA e no sistema funcional de catecolaminas (STECKLER; HOLSBOER, 1999). Em resposta a ativação do eixo HPA por estímulos estressores (estresse agudo ou crônico, por exemplo), os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) geram e liberam o fator liberador de corticotropina (CRF), que promove a secreção de adrenocorticotropina (ACTH) da hipófise anterior (NESTLER *et al.*, 2002). Portanto, a superativação do eixo HPA contribui para os sintomas depressivos principalmente através do aumento dos níveis de cortisol no sangue e aumento da transmissão de CRF nas regiões do cérebro (ARBORELIUS *et al.*, 1999).

O comportamento emocional e a inflamação se encontram no tronco encefálico. A primeira área de integração é o núcleo do trato solitário (NTS), um importante núcleo bulbar que processa diversas informações sensoriais. O NTS recebe informações dos nervos glossofaríngeo, facial, vago e trigêmeo. Além disso, ainda recebe informações de PA via barorreceptores aórticos e carotídeos, e de quimiorreceptores carotídeos. O NTS emite projeções para diversas áreas entre elas, a região rostroventrolateral bulbar (RVLM) e para o PVN (KAWANO; MASUKO, 2010; SCHNIEDER *et al.*, 2014

O PVN parece ser o ponto em comum entre o estresse, a ansiedade, a depressão e a inflamação (Figura 3). Os estímulos que chegam ao PVN, área muito importante na resposta ao estresse, resultam na ativação do eixo HPA, gerando uma resposta ao estímulo inicial (como a inflamação periférica proveniente da asma alérgica) (BOROVIKOVA *et al.*, 2000; PAVLOV; TRACEY, 2017). Com a ativação do eixo HPA, a região do PVN estimula a produção de

corticotropina, que por sua vez promove a secreção de adrenocorticotropina (ACTH) pela hipófise anterior. Uma vez na corrente sanguínea, o ACTH vai atuar nas glândulas adrenais e promover a liberação de cortisol. O cortisol em altas concentrações apresenta efeito anti-inflamatório (reduzindo também a liberação de histaminas) e imunossupressor, além de inibir a ativação do eixo HPA (ARBORELIUS *et al.*, 1999; NESTLER *et al.*, 2002), configurando o reflexo anti-inflamatório mediado pela resposta aferente vagal. Por outro lado, com o tempo e com exposição contínua a estressores, a função do eixo HPA e sistema imunológico podem se tornar desreguladas (MICHOPoulos *et al.*, 2017). A ativação do nervo vago pode ativar ainda mais o núcleo parabraquial (núcleo envolvido no controle da ventilação pulmonar) e as regiões límbicas do cérebro através de suas projeções, aumentando assim os níveis de citocinas no centrais (DANTZER *et al.*, 2008).

Somado a isso, uma série de descobertas em neurociências, delinearam os circuitos neurais que englobam as estruturas corticais e subcorticais, responsáveis pela geração das emoções humanas. Atualmente é aceito que as seguintes áreas participam da maioria dos processos emocionais: córtex pré-frontal, amígdala, córtex cingulado anterior, hipocampo e ínsula (DAVIDSON, 2003; ROXO *et al.*, 2011). Sendo que, a amígdala é considerada um centro neural essencial para a modulação dos comportamentos de ansiedade (ASAMI *et al.*, 2018). Estudos sobre o condicionamento do medo, em modelos animais, evidenciaram que os principais papéis de dois núcleos da amígdala, a amígdala basolateral (BLA) e o núcleo central da amígdala (CeA), estão envolvidos na ansiedade. O BLA integra informações sensoriais do ambiente e, por meio de suas projeções, excita o CeA. A amígdala subsequentemente desencadeia respostas defensivas por meio de projeções eferentes para regiões como a estria terminal, o hipocampo, o corpo estriado ventral, o córtex orbitofrontal, a substância cinzenta periaquedutal e o hipotálamo (LEDOUX, 2000; ROBINSON *et al.*, 2019).

O hipocampo, por sua vez transmite informações contextuais sobre a ameaça ambiental ao córtex pré-límbico (ADHIKARI, 2010; SWANSON, 1981). Além disso, estudos usando tarefas

de conflito operante sugeriram que o hipocampo tem um papel fundamental na tomada de decisões em situações em que há um conflito entre a aproximação de recompensas e a fuga de punições, um cenário que induz ansiedade em todas as espécies (ITO, LEE 2016). E por fim, as regiões do córtex pré-frontal também estão envolvidas na ansiedade por meio de seu papel na memória de trabalho (TCHANTCHOU *et al.*, 2017).

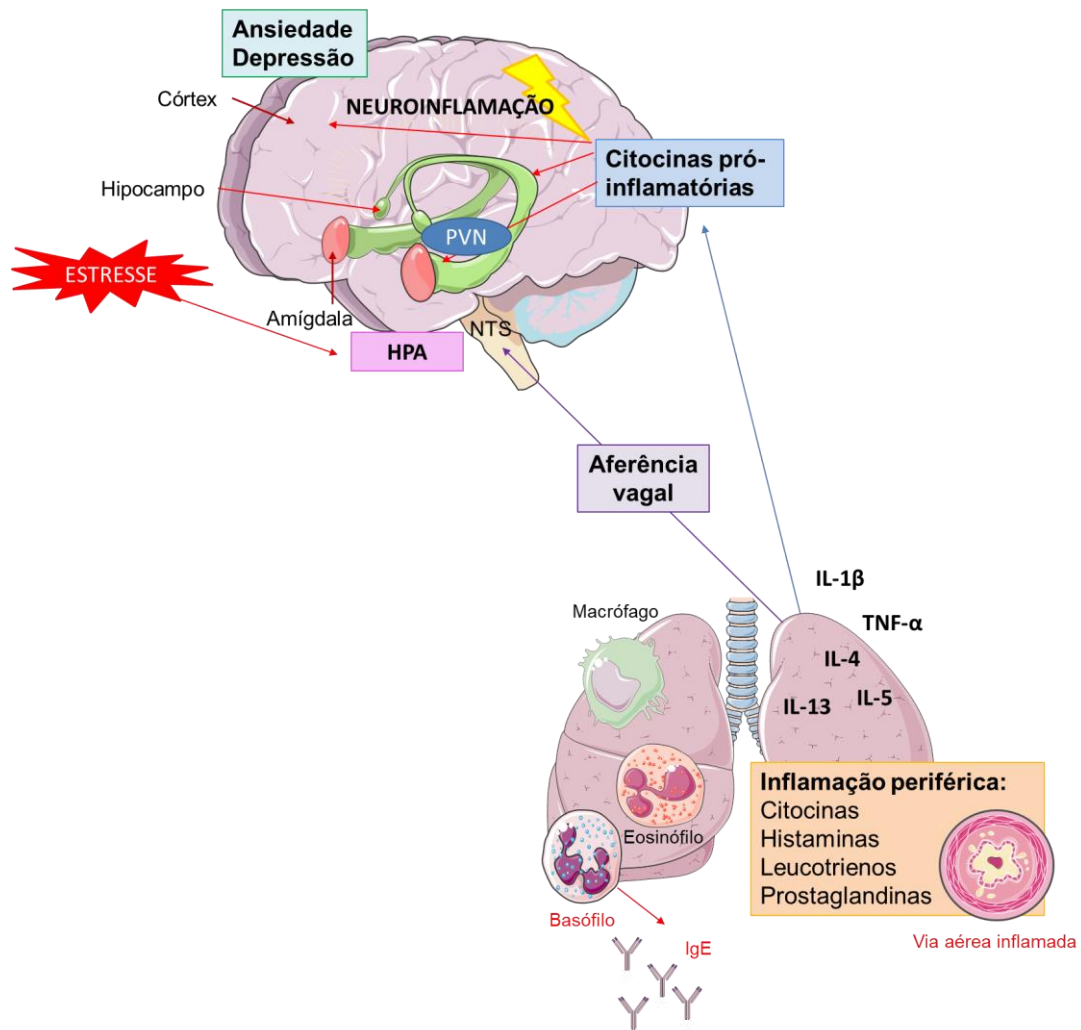


Figura 3. Resumo gráfico: inflamação e comportamento emocional. A inflamação periférica relacionada a asma alérgica pode induzir a neuroinflamação e resultar em alterações psiquiátricas como a ansiedade e a depressão. Os mediadores inflamatórios no pulmão podem se ligar a receptores seletivos das terminações nervosas aferentes, causando ativação de áreas cerebrais, ativação de microglia e liberação de neurotransmissores. Outra possibilidade, seria mediadores inflamatórios alcançarem o SNC via áreas desprovidas de BHE, ou via aferência vagal se projetando para o NTS. Dessa forma, o sinal inflamatório periférico, ativaria células microgliais, gerando a neuroinflamação. A neuroinflamação por sua vez, pode influenciar a excitabilidade neuronal, liberação de neurotransmissores e expressão de receptores. As alterações desencadeadas pela inflamação no SNC em regiões como amígdala, hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal (áreas responsáveis pelo controle emocional) poderiam ser responsáveis por gerar os comportamentos do tipo ansioso e depressivo.

1.5. Asma e alteração no comportamento emocional

Um aspecto que agrava o controle da asma, é a sua associação com ansiedade e depressão. Estes fatores psicológicos apresentam interferência no manejo da asma, e dessa forma, elevam os gastos com a doença para o sistema de saúde (CAMPANHA; FREIRE; FONTES, 2008; MOZZINI MONTEIRO *et al.*, 2016). Estudos anteriores mostraram que o custo direto com a asma (serviços de saúde e medicação) foi duas vezes maior em pacientes com asma não controlada em relação aos pacientes com asma controlada, sendo que a falta de controle está diretamente relacionada com a utilização dos serviços de saúde (MOZZINI MONTEIRO *et al.*, 2016). Essas comorbidades estão presentes em cerca de 80% dos pacientes asmáticos (DI MARCO *et al.*, 2010; MOZZINI MONTEIRO *et al.*, 2016). Além disso, a ansiedade está presente em 50% dos pacientes com asma de difícil controle (VIEIRA, ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON *et al.*, 2011). Somado a isso, pacientes com asma grave e comorbidades psiquiátricas tem cerca de 11 vezes mais chance de terem exacerbações e 5 vezes mais chance de serem hospitalizados em um ano (BRINKE *et al.*, 2001).

A associação entre asma e ansiedade também foi investigada em modelo animal. Basso *et al.* (2003) mostraram pela primeira vez a existência de comunicação neuro-imune em um modelo de alergia alimentar. Neste estudo, os animais alérgicos exibiram maior comportamento do tipo ansioso nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevada, evitaram o contato com o alérgeno no teste de preferência por sacarose e ainda apresentaram aumento da atividade de c-Fos em neurônios do PVN e CeA, regiões do SNC que estão envolvidas em padrões comportamentais relacionados ao controle afetivo e emocional. Costa-Pinto *et al.*, (2007) mostraram que camundongos com alergia alimentar, exibiram também comportamento mais ansioso, aumento de corticosterona sérica e maior marcação Fos positiva em núcleos relacionados ao controle emocional. Em outro estudo, camundongos submetidos à inflamação pulmonar alérgica apresentaram aumento de atividade do PVN e CeA, e evitaram entrar em um compartimento

previamente associado ao alérgeno, ovoalbumina que foi utilizado para indução da inflamação pulmonar alérgica crônica (COSTA-PINTO *et al.*, 2005). Estes estudos mostraram também que a atividade dessas regiões cerebrais e o comportamento que se segue ao desafio alérgico dependem da presença de anticorpos IgE e da degranulação de mastócitos (COSTA-PINTO *et al.*, 2005 e 2007; BASSO *et al.*, 2003).

Este condicionamento também já havia sido demonstrado em humanos. Em 1886, Mackenzie observou que pacientes alérgicos desencadeavam crises em frente a uma rosa de plástico, o que foi chamado de “efeito da rosa”. Sem saber se a rosa era verdadeira ou não, o comportamento natural era evitar a qualquer esta fonte de alergia ou mesmo, a imagem da fonte (JOHN NOLAND MACKESZIE, 1886). Esta observação foi uma das primeiras evidências da existência de uma comunicação neuroimune, ou seja, que as reações pulmonares alérgicas podem alterar a atividades de vias no SNC (COSTA-PINTO, FREDERICO AZEVEDO *et al.*, 2005).

Dehdar *et al.* (2019) mostraram também em modelo de asma alérgica induzida por OVA, que ratos sensibilizados apresentaram maior comportamento do tipo ansioso, maior ativação de micróglia e astrócitos, redução no volume da amígdala, além do aumento da atividade elétrica no córtex medial pré-frontal e amígdala. Sugerindo que os desafios imunológicos periféricos, para estimular os sintomas alérgicos da asma, também alteram a atividade do córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala e a atividade das células imunes no cérebro (DEHDAR *et al.*, 2019). Indicando possíveis mecanismos envolvidos na patogênese de distúrbios emocionais relacionados ao quadro asmático.

Em outro estudo em modelo de asma, Zuang *et al.* (2018) observaram que camundongos fêmeas apresentaram maior comportamento do tipo ansioso, redução de projeções dendríticas (comprimento e quantidade) hipocampais e aumento da expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro no hipocampo. No entanto, após um tratamento com budesonida (glicocorticoide anti-inflamatório), o comportamento do tipo ansioso e o efeito sobre a quantidade de projeções foram atenuados, mas não o comprimento dos dendritos ou a expressão de fator neurotrófico derivado do

cérebro (ZHUANG *et al.*, 2018). Os autores descreveram que esses dados sugerem que o tratamento com corticoides melhorou os sintomas comportamentais associados a asma alérgica, mas não alterou o prejuízo da função hipocampal associada a asma. O hipocampo é uma região que possui muitos neurônios serotoninérgicos, no entanto, a densidade de receptores do tipo 5-HT(1) no hipocampo e na amígdala parece estar reduzida em indivíduos deprimidos (CHEETHAM *et al.*, 1990); enquanto, o receptor 5-HT(2) é regulado positivamente (MIKUNI *et al.*, 1992).

Lechin *et al.* (1996) correlacionaram a gravidade clínica da asma a níveis de serotonina, norepinefrina, epinefrina, dopamina e cortisol livres no plasma, que se apresentaram significativamente mais elevados em pacientes asmáticos sintomáticos do que em pacientes assintomáticos. Mais do que isso, os pesquisadores concluíram que a serotonina livre foi o único fator neuroendócrino intimamente associado à gravidade clínica e função pulmonar, visto que a concentração de serotonina livre em pacientes sintomáticos com asma se correlaciona positivamente com o estado clínico e negativamente com função pulmonar. Assim, os autores postularam que reduzir a concentração de serotonina livre no plasma pode ser útil no tratamento de pacientes com asma (LECHIN *et al.*, 1996; PRETORIUS, 2007).

Em outro estudo, 69 crianças com asma foram designadas de forma aleatória receber Tianeptina (uma droga conhecida por ser capaz de reduzir os níveis de serotonina livre no plasma e aumentar recaptção neural pré-sináptica) e/ou placebo em um estudo cruzado duplo-cego que durou 52 semanas. Os resultados indicaram que a Tianeptina provocou uma redução da classificação clínica, dos níveis plasmáticos de serotonina livre e aumento da função pulmonar, suprimindo a asma (LECHIN *et al.*, 1998). A Tianeptina aumenta a recaptção neural pré-sináptica de 5-HT e, portanto, diminui a neurotransmissão serotoninérgica, resultando em uma diminuição da serotonina no cérebro (NICKEL *et al.*, 2003; PRETORIUS, 2007).

Silva (2012) aponta que o fator psicológico apresenta um papel importante na asma brônquica, como elemento precipitante das crises ou na progressão da doença (SILVA, 2012). O

componente emocional, portanto, parece ter influência em três aspectos do quadro asmático: no desencadeamento das crises, na persistência ou agravamento das crises e na resistência ao tratamento (DIMARCO *et al.*, 2010; SILVA, 2012; VIEIRA, A. A. *et al.*, 2011). Existem algumas situações no quadro asmático que podem induzir a um quadro de ansiedade, por exemplo, durante um ataque, quando a dificuldade de respirar é considerada ameaçadora, isso pode ser um gatilho para o estado de ansiedade (THOREN; PETERMANN, 2000). Além disso, a associação entre asma e ansiedade pode atrapalhar a percepção dos primeiros sinais de resistência das vias aéreas, e por consequência dificultar o controle da crise asmática (TILLER, 1990).

Embora esta interação ainda não esteja bem elucidada, fica evidente que controlar a ansiedade é importante para o tratamento do paciente asmático. No entanto, os medicamentos utilizados para controle de psicopatologias, como a ansiedade e a depressão, não são ideais para o tratamento da asma, e vice-versa. Por outro lado, embora ainda controverso, há estudos que mostram que o tratamento com corticoides agrava os distúrbios de comportamento (MOZZINI MONTEIRO *et al.*, 2016). Assim, desta forma um medicamento que combine os efeitos anti-inflamatórios e ansiolíticos seria muito apropriado para pacientes asmáticos que apresentam comorbidades psicopatológicas.

1.6. O SRA e alteração de comportamento emocional

O SRA também está envolvido na fisiopatologia de transtornos de psiquiátricos, como ansiedade e depressão (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2016; BILD; CIOBICA, 2013). Ratos com níveis reduzidos de angiotensinogênio no cérebro apresentaram comportamentos similares à ansiedade e depressão. No entanto, esses comportamentos foram revertidos após infusão intracerebroventricular (ICV) de Ang-(1-7) (KANGUSSU *et al.*, 2013). Ademais, outros estudos mostraram que camundongos com a deleção genética do receptor Mas apresentaram maior comportamento do tipo ansioso quando submetidos ao teste de labirinto em cruz elevada, indicando a importância do eixo contra-regulatório sobre o comportamento emocional

(WALTHER *et al.*, 1998). Além disso, a ausência de precursores para a formação de Ang II podem reduzir o comportamento depressivo (OKUYAMA *et al.*, 1999), assim como a inibição farmacológica da ECA (GIARDINA; EBERT, 1989).

Kangussu *et al.* (2017) mostraram também que um rato transgênico que tem níveis circulantes aumentados de Ang-(1-7) apresentou redução do comportamento ansioso. Mais importante, neste estudo foi mostrado que o tratamento ICV com A-779 abole esse comportamento. Neste sentido, diversos estudos apontam que a maior expressão do eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas apresenta um importante efeito ansiolítico e antidepressivo em contrapartida com ativação do eixo Ang II/ receptor AT₁ (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2016; BILD; CIOBICA, 2013; GIARDINA; EBERT, 1989; KANGUSSU *et al.*, 2013; OKUYAMA *et al.*, 1999; VIAN *et al.*, 2017; WALTHER *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2016).

A fisiopatologia da asma já está bem caracterizada em humanos e modelos experimentais, no entanto, pouco se sabe a respeito da influência da asma na atividade cerebral e sobre comportamentos emocionais ou de enfrentamento ao estresse (COSTA-PINTO, FREDERICO AZEVEDO *et al.*, 2005). Nas últimas décadas, estudos mostraram correlação entre a asma e níveis elevados de ansiedade/depressão, especialmente mostrando que as crises asmáticas estão associadas a mudanças no estado emocional e aumento dos níveis de ansiedade/depressão (DI MARCO *et al.*, 2010; VIEIRA, A. A. *et al.*, 2011). Somado a isso, cerca de 70% dos pacientes asmáticos apresentam algum transtorno emocional (ROCHA *et al.*, 2021; VIEIRA, A. A. *et al.*, 2011). Estes dados evidenciam a importância do controle da emocional para o tratamento da asma. No entanto, poucos estudos da literatura apresentam alguma solução para esse tema.

Nesse sentido, investigar os mecanismos envolvidos na interação asma e ansiedade/depressão, é importante para o melhor entendimento da fisiopatologia dessa doença e para identificar novas e, ainda necessárias, estratégias terapêuticas. Portanto, o conhecimento de mediadores endógenos, que apresentam efeitos anti-inflamatório, anti-fibrótico, pró-resolutivo e

ainda, ansiolítico, pode levar ao desenvolvimento de ferramentas mais efetivas para o controle e o tratamento da asma.

2. OBJETIVO

Caracterizar o efeito ansiolítico da Ang-(1-7) em modelo murino de asma, avaliando se a Ang-(1-7) poderia apresentar efeito benéfico adicional para o tratamento da asma alérgica, atenuando a ansiedade, uma comorbidade importante associada a esta doença.

3. ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS:

Protocolo 1: Avaliar o efeito do tratamento periférico (via oral ou intranasal) com a Ang-(1-7) sobre o comportamento do tipo ansioso/depressivo de animais submetidos a inflamação pulmonar alérgica. Neste protocolo foram avaliados:

- Comportamento do tipo ansioso/depressivo por meio dos testes de campo aberto e suspensão pela cauda;
- Índice de inflamação pulmonar por meio da avaliação do grau de infiltração de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) e pulmão.

Protocolo 2: Avaliar o comportamento de animais transgênicos, com deleção do receptor Mas, submetidos a modelo experimental de asma. Neste protocolo foram avaliados:

- Comportamento do tipo ansioso/depressivo por meio dos testes de campo aberto e suspensão pela cauda;
- Índice de inflamação pulmonar por meio da avaliação do grau de infiltração de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) e pulmão.

Protocolo 3: Avaliar se o efeito ansiolítico da Ang-(1-7) se restringe a melhora da inflamação pulmonar ou se está associado a efeito central direto. Para isso, foi realizado *i*) infusão ICV de Ang-(1-7) em animais asmáticos; *ii*) infusão ICV do antagonista do receptor Mas, o A-779, em animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral ou intranasal. Nestes grupos foram avaliados:

- Comportamento do tipo ansioso/depressivo por meio dos testes de campo aberto e suspensão pela cauda;
- Índice de inflamação pulmonar por meio da avaliação do grau de infiltração de leucócitos no LBA e pulmão.

Protocolo 4: Avaliar o efeito do tratamento oral com a Ang-(1-7) sobre a ativação de áreas cerebrais envolvidas no comportamento ansioso de animais submetidos a inflamação pulmonar alérgica, determinando a atividade de c-Fos em áreas cerebrais, tais como, hipocampo e PVN.

Protocolo 5: Dosar mediadores cerebrais sabidamente relacionados com ansiedade/ depressão em animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral ou intranasal, com o objetivo de explorar os mecanismos centrais envolvidos no efeito ansiolítico da Ang-(1-7).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Nesse estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c, entre de 8-10 semanas de idade, obtidos do Centro de Bioterismo (CeBio), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Utilizamos também animais transgênicos (genotipados), com deleção do receptor Mas (Mas KO) e camundongos C57BL/6J, entre de 8-10 semanas de idade, fornecidos pelo biotério de animais transgênicos do Laboratório de Hipertensão, do ICB/UFMG. Todos os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Departamento de Fisiologia, em estante ventilada, ciclo claro-escuro de 12/12h com acesso livre a ração e água. Os protocolos realizados neste estudo foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo número 290/2018.

4.2. Indução de inflamação pulmonar alérgica.

Para indução de inflamação pulmonar alérgica, os animais foram imunizados e desafiados com OVA, de acordo com o método padronizado em nosso laboratório por Magalhães *et al.*, (2018) e está mostrada na Figura 4. Inicialmente, os camundongos foram imunizados por meio de injeção intraperitoneal (*i.p.*), com 0,2 ml de uma solução contendo 100 µg de OVA e hidróxido de alumínio (2%), no 0 e 7º dia. Do 12º ao 18º dia, os animais dos grupos alérgicos foram anestesiados diariamente com isoflurano 5%, e 10µg OVA 1% diluída em solução tampão fosfato era administrado por via intranasal no volume de 20 µl por animal. Para o último desafio, no 19º os animais eram individualmente desafiados por nebulização com OVA 1%, como parte do protocolo do teste comportamental de esquiva passiva, que não foi incluído na tese. Os animais do grupo controle receberam PBS, 0,2 ml *i.p.* e 20 µl intranasal (ou nebulização) nos mesmos intervalos de tempo dos grupos alérgicos.

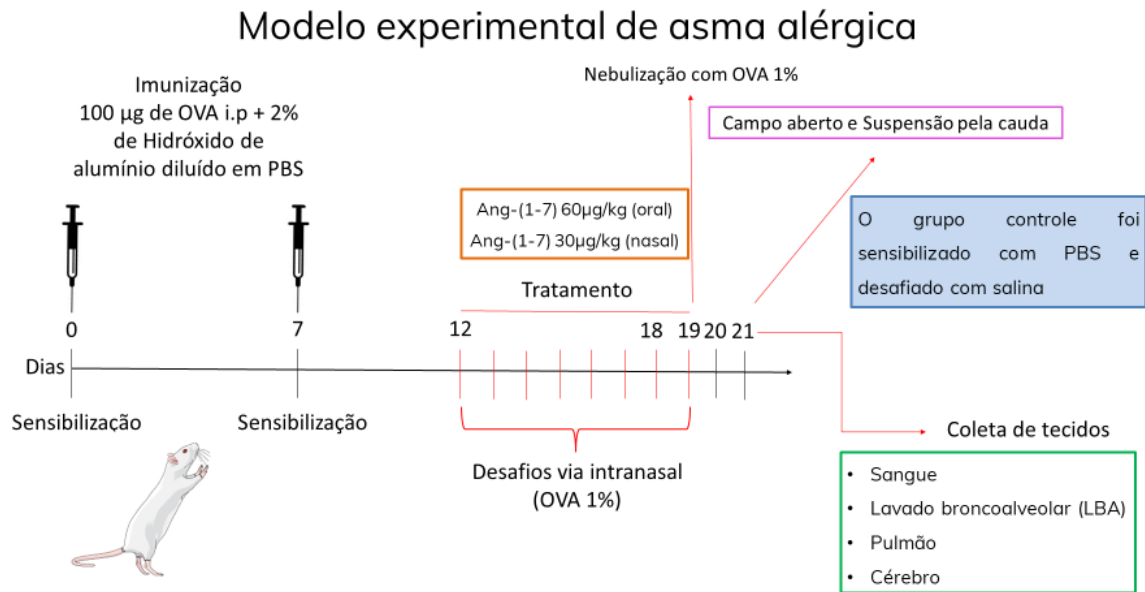


Figura 4. Protocolo de modelo animal de asma alérgica e tratamentos com Ang-(1-7) por duas diferentes vias periféricas (oral 60µg/kg e intranasal 30µg/kg).

4.3. Administração de Ang-(1-7) ou do antagonista do receptor Mas

A Ang-(1-7) foi administrada diariamente por via oral (gavagem) na dose de 60 µg/kg incluída em 92 µg/Kg de hidroxipropil-ciclodextrina (HPβCD) e administrada no volume total de 100µl ou por via intranasal na dose de 30 µg/kg de Ang-(1-7) incluída em 46 µg/Kg de HPβCD (administrada no volume total de 20 µl) logo após a administração de OVA no período de desafio, sendo que o tratamento com Ang-(1-7) via intranasal era realizado 30 minutos após o desafio com ovalbumina. As doses de Ang-(1-7) para administração oral e intranasal foram escolhidas com base em estudos prévios de nosso laboratório. Os animais não tratados receberam 92 µg/Kg de HPβCD diluída em água (via oral) ou 46 µg/Kg de HPβCD em salina 0,9% (intranasal) (MAGALHAES *et al.*, 2018; 2016; 2015; RODRIGUES-MACHADO *et al.*, 2013). Ang-(1-7) (50 ng/h) ou A-779 (200 ng/h) foram infundidos no ventrículo lateral (ICV) através de minibombas osmóticas (ALZET, modelo 1007D; 0,5 µL/h ou modelo 2002; 0,25 µL/h). As minibombas foram preenchidas com solução contendo Ang-(1-7) ou A-779, 24h antes de sua implantação de acordo com instrução do fabricante.

4.4. Canulação do ventrículo lateral

Para a infusão ICV, no 9º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos a canulação do ventrículo lateral (Figura 5). Para isso cânulas metálicas (3,2 mm de comprimento) confeccionadas com dispositivo para infusão endovenosa (27G) foram implantadas em animais anestesiados (60 mg/kg de cetamina associado a 8 mg/kg de xilasina) no ventrículo lateral direito (0,5 mm posterior e 1,0 mm lateral ao bregma e 2,0 mm abaixo da superfície do osso) com auxílio de estereotáxico (David Kopf). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose subcutânea de tramadol (12,5mg/kg). Os parâmetros utilizados para a canulação do ventrículo lateral foram estabelecidos pelo atlas de Paxinos e Watson (2002).

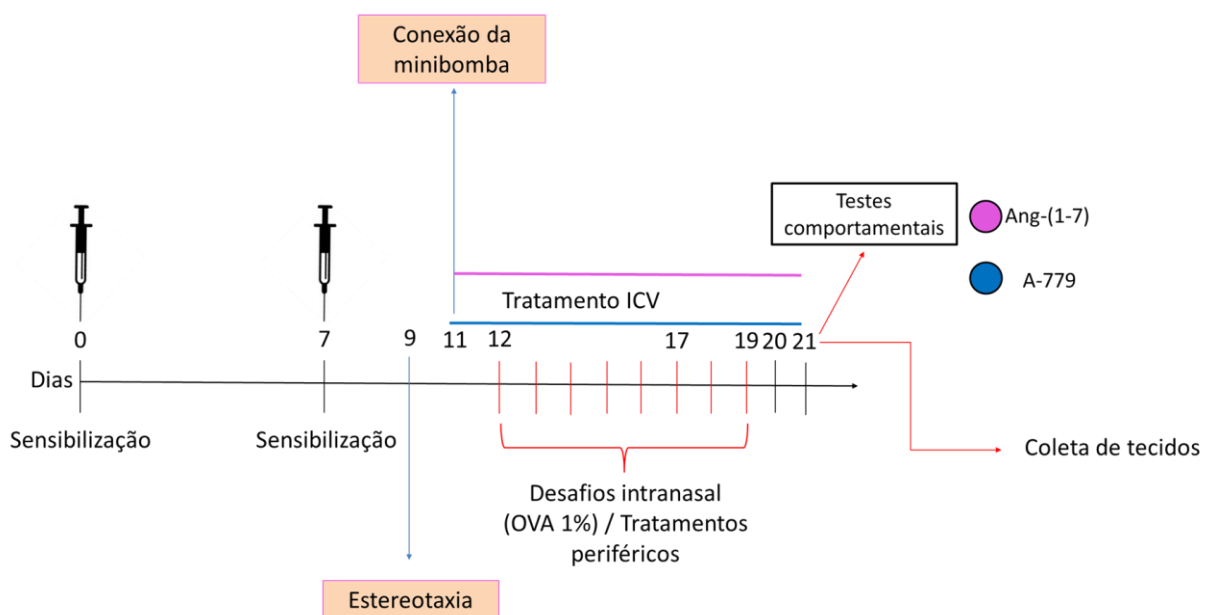


Figura 5. Protocolo de indução de asma alérgica e cirurgia estereotáxica para implantar minibomba osmótica via ICV (Ang-1-7 ou A-779) em camundongos submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.

4.5. Teste em campo aberto

O teste em campo aberto é muito utilizado para avaliar a atividade locomotora e comportamento do tipo ansioso, é baseado na exposição do animal a uma situação de estresse, de maior ou menor intensidade (um ambiente novo), para medir as respostas comportamentais

(ANISMAN; ZACHARKO, 1982; BREMNER, 1999; PEETERS; BROEKKAMP, 1994). Neste teste, os camundongos foram individualmente posicionados em uma arena de acrílico (30cm X 30cm) demarcada por 9 quadrantes e o número de cruzamentos nos quadrantes foi mensurado durante 5 minutos (Figura 6). Segundo Choleris *et al.*, (2001) a redução na ambulação (número de cruzamentos) indica comportamento do tipo ansioso (CHOLERIS *et al.*, 2001). Além da locomoção, um parâmetro utilizado para avaliar a ansiedade, é contabilizar o número de levantamentos (*Stand up*). Ou seja, quantas vezes o animal se apoia apenas nas patas traseiras. Quanto menor o número de levantamentos, maior o comportamento do tipo ansioso.

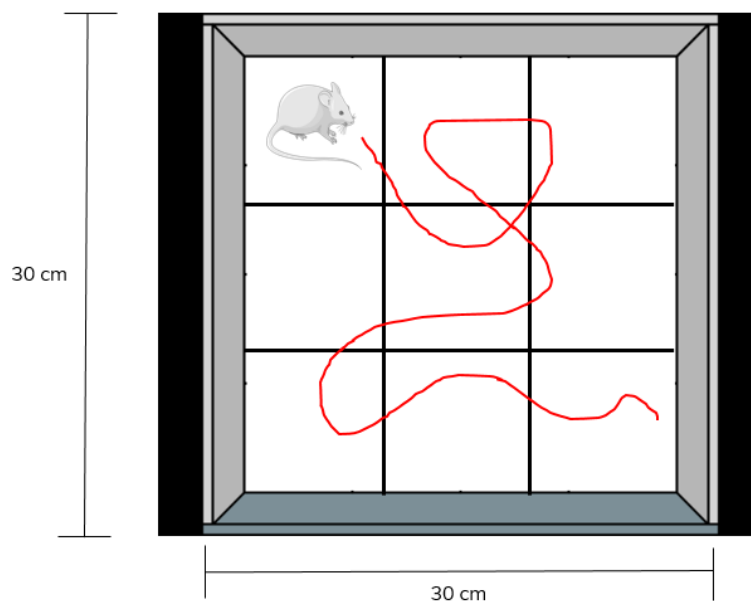


Figura 6. Imagem ilustrativa do teste em campo aberto.

4.6. Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda é amplamente utilizado para avaliar o comportamento do tipo depressivo, pois é capaz de induzir o modelo de desespero comportamental (THIERRY *et al.*, 1986). O procedimento consistiu em suspender cada animal pela cauda, com o auxílio de uma fita adesiva, em uma caixa de acrílico na altura de 30cm, de maneira tal que o animal permanecesse com a porção ventral do corpo voltada para o avaliador. Cada animal permaneceu nesta posição durante 5 min. Foi cronometrado o tempo de imobilidade que incluiu ausência de movimentos

bruscos (o animal podia movimentar levemente a cabeça ou as patas dianteiras, sem que mexesse o corpo) ou ausência total de movimento (Figura 7).

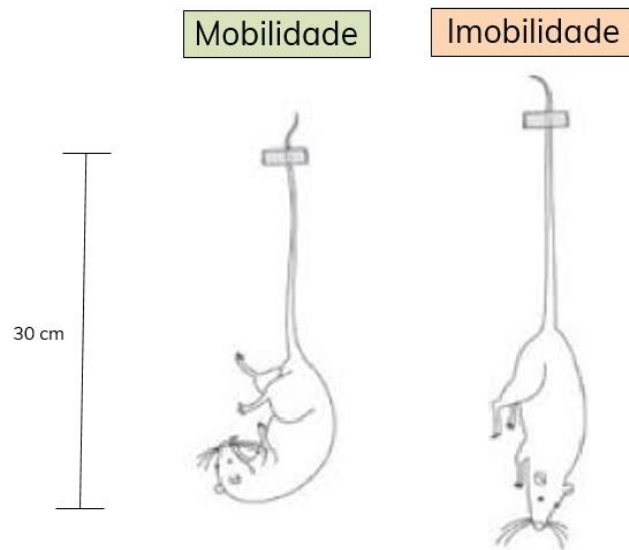


Figura 7. Imagem ilustrativa do teste de suspensão pela cauda (Modificado de E. Kędzińska, I. Wach, 2016).

4.7. Coleta de sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e pulmão

Quarenta e oito horas após o último desafio os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (60 mg/kg) associado a xilazina (8 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a anestesia foi realizada uma incisão na artéria carótida para a coleta de sangue. A seguir, a traqueia foi exposta e isolada com um fio de sutura, e canulada com um cateter de polipropileno. Para a obtenção do LBA, 1 ml de tampão fosfato (PBS, 0.1 M, pH 7.4) foi injetado pela cânula traqueal e aspirada em seguida para recuperar o lavado. O líquido recolhido foi centrifugado à 4°C à uma velocidade de 1700 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em PBS 0.1 M contendo 3% albumina sérica bovina (BSA). Ao término da coleta, foi realizada a toracotomia esternal para a retirada dos pulmões.

4.8. Contagem de leucócitos totais

Alíquotas do LBA foram diluídas em corante de Turk (proporção de 1:10). A contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual.

4.9. Contagem diferencial de leucócitos

As células foram fixadas, coradas com MayGrunwald-Giemsa e examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x), foram contadas 100 células (média de 3 contagens) por lâmina diferenciando-se 3 tipos celulares: monócitos, eosinófilos e linfócitos. A quantificação de cada tipo celular presente no espaço alveolar foi calculada pela relação entre o número de cada tipo celular obtido nesta análise e o número de leucócitos totais obtido na contagem total.

4.10. Determinação do grau de infiltrado inflamatório no pulmão

4.10.1. Método Histológico

Fragmentos do pulmão foram desidratados, diafanizados, parafinados e incluídos em parafina. Cortes de aproximadamente 4 µm de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (HE) para a análise quantitativa do grau de infiltração de leucócitos no pulmão.

Foram capturadas 3 imagens de cortes do pulmão de cada animal, através do Scanner de laminas do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI/UFMG). A área infiltrada das vias aéreas foi analisada utilizando o programa Image Pro Plus IPWin 4. O número de pixels compreendidos na área de deposição de matriz extracelular nas vias aéreas foi obtido a partir da imagem real, a seguir o software apresenta uma imagem binária com o valor correspondente a deposição de leucócitos no tecido pulmonar.

4.10.2. Método enzimático para detecção da presença de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos.

O grau de infiltrado de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no pulmão foi avaliado pela dosagem da concentração das enzimas EPO (peroxidase eosinofílica), MPO (mieloperoxidase), NAG (N-acetilglucosaminidase). A concentração dessas enzimas representa indiretamente a quantidade de células inflamatórias infiltradas no tecido. Para esta análise, o lóbulo médio do pulmão direito solubilizado em tampão fosfato de sódio, pH 5,4 (1ml/mg), as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas à 10.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C para posterior dosagem de citocinas. O precipitado foi ressuscitado em salina contendo EDTA (1ml/ mg de tecido) e centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos. A seguir o sobrenadante foi despregado e adicionou-se NaCl 0,2% e NaCl,6% contendo glicose 5% gelada (1ml/ mg de tecido). As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em tampão fosfato contendo HTAB 5% e homogeneizado por 30 segundos (vortex). As amostras foram congeladas e descongeladas sucessivamente por 3 vezes, em nitrogênio líquido, em seguida foram submetidas novamente à centrifugação e o sobrenadante coletado para o ensaio.

Para determinar a atividade da MPO, 75 µl do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços em duplicata, incubado com 75 µl de tampão contendo TMB/H₂O₂ por 30 minutos a 37°C. Para interromper a reação foi adicionado 75 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A densidade óptica foi medida em 450 nm.

Para determinar a atividade da enzima EPO, 75 µl do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços, incubado com 75 µl de tampão mais OPD/H₂O₂ por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 75 µl de H₂SO₄ e a densidade óptica foi medida em 492 nm.

Para determinar a atividade da enzima NAG o precipitado obtido no processamento do pulmão, acima descrito, foi ressuscitado em 2,0 mL de solução salina 0,9% com Triton X-100

a 0,1% gelado. As amostras foram homogeneizadas em vórtex até a obtenção de uma suspensão homogênea e, posteriormente foram centrifugadas à 3.000 rpm durante 10 minutos. A seguir, 100µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços em duplicata e a estes foram adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminidase), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, e em seguida, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Por último, foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm.

4.11. Imunohistoquímica para c-Fos

4.11.1. Modelo experimental.

Para indução de inflamação pulmonar alérgica nos animais que seriam sacrificados para determinação da expressão de c-Fos, inicialmente os camundongos foram imunizados através de injeção *i.p.* de OVA (100 µg em 0,2 ml de uma solução contendo hidróxido de alumínio a 2%) no 0 e 7º dia. No 12º dia os animais dos grupos alérgicos foram anestesiados com isoflurano 5% e desafiados com OVA 1% diluída em PBS, que foi administrada no volume de 20 µl por via intranasal (Figura 8). O tratamento com Ang-(1-7) por via oral foi realizado no 12º dia, 6 horas antes do desafio com OVA, para que no momento do desafio, a concentração de Ang-(1-7) circulante fosse máxima (MARQUES *et al.*, 2011). Os animais do grupo controle receberam PBS, 0,2 ml *i.p.* e 20 µl intranasal, nos mesmos intervalos de tempo dos grupos alérgicos. Noventa minutos após o desafio com OVA (tempo de maior expressão da proteína c-Fos), os animais foram sacrificados e o cérebro coletado (Figura 9).

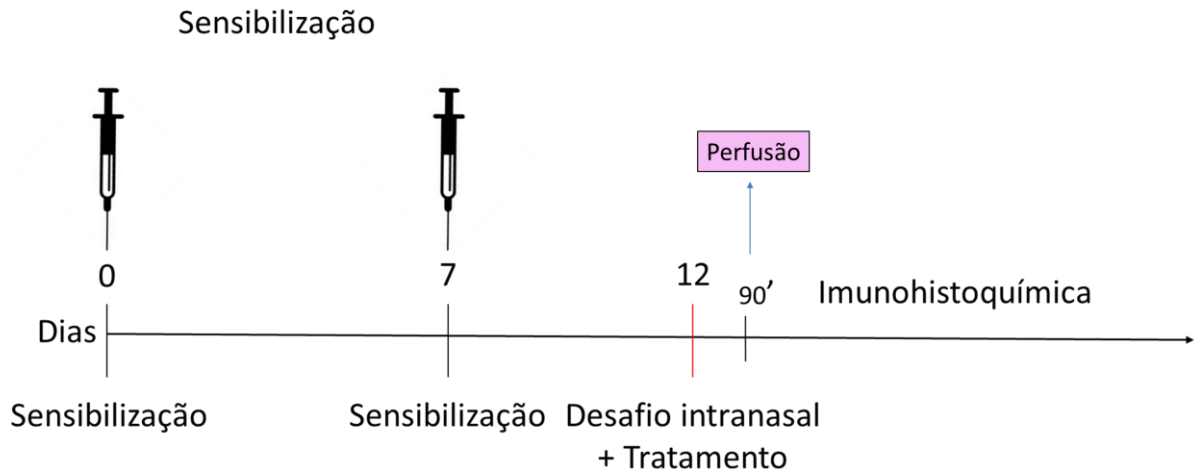


Figura 8. Protocolo de sensibilização para modelo de asma alérgica e perfusão cardíaca para imunohistoquímica.

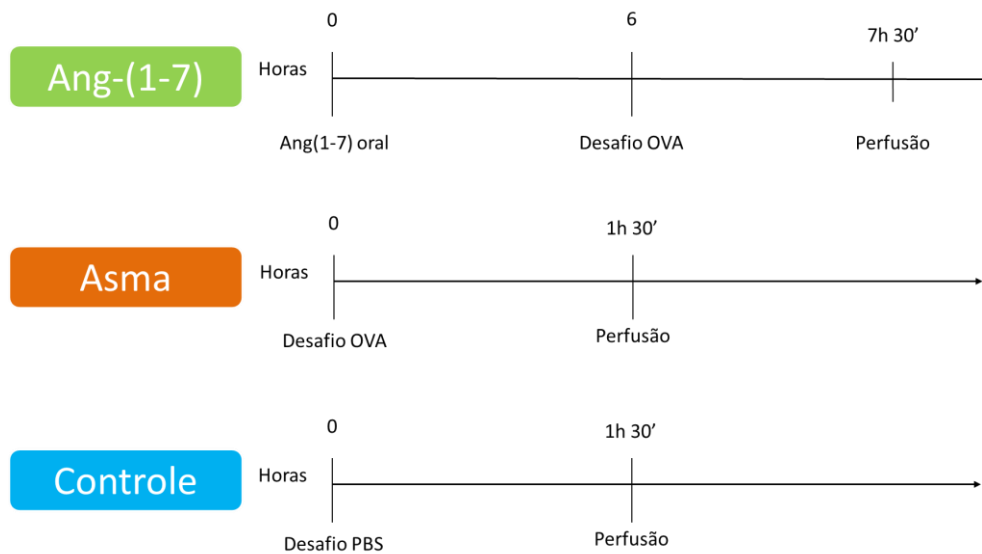


Figura 9. Tempos de tratamento e desafio para os grupos experimentais: Ang-(1-7) via oral, asmático e controle.

4.11.2. Coleta do cérebro

Os animais foram anestesiados por injeção *i.p.* com a mistura de cetamina e xilazina, colocados em decúbito dorsal e a caixa torácica aberta para expor o coração. O cérebro dos animais foi perfundido, inicialmente, com 10 ml de tampão fosfato (PB, 0.1 M, pH 7.2, contendo 0,1% de heparina) seguido por 20 ml de uma solução de fixador composta por paraformaldeído a 4% diluído em PB 1%, com auxílio de uma agulha metálica (26G) introduzida no ventrículo esquerdo

e conectada por tubo de polietileno a uma bomba de infusão (3ml/ min). Após a perfusão, os cérebros foram removidos e colocados na solução fixadora de paraformaldeído (4%, pH 7,4) por 2 horas e depois em solução de sacarose 30% diluída em PB por 48 horas a 4°C.

4.11.3. Imunohistoquímica

Foram realizados cortes frontais seriados do cérebro (35 µm) em criostato a -20°C e distribuídos em diferentes poços de placas de cultura de 12 poços. Inicialmente, as secções foram incubadas em solução contendo soro de cabra (*Normal goat serum*; 1:250; Jackson Immunoresearch Laboratories, USA) por 2h. Posteriormente os cortes de cérebro foram incubados *overnight* com o anticorpo primário (Fos α -Rabbit na diluição 1:1000; Santa Cruz Biological, USA), seguido por 2h de incubação com anticorpo secundário (Goat anti-Rabbit biotilado na diluição 1:500; Dako-Agilent, USA). Os cortes foram então incubados por 2h com o complexo avidina-biotina (ABC-Standart, 1:50; Vector Laboratories, USA) e a imunorreatividade visualizada pela subsequente adição de H₂O₂, 0,007% e diaminobenzidina [DAB, 50 mg/100 ml; Sigma, USA) por 5min. Os cortes foram montados em lâminas de vidro, desidratadas e recobertas em lamínulas com entellan (Merck, BR). Para contar células c-Fos positivas e para controle da área a ser avaliada, os cortes foram escaneados com Scanner de Laminas 3D HISTECH (2005-2022) do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI). Foi padronizado para cada área (hipocampo e o PVN) de cada animal a fatia em que a contagem foi realizada. A partir do programa Slide Viewer disponibilizado pelo CAPI, foram realizadas imagens do hipocampo em aumento de 2.4x e PVN em 4.0x. As imagens foram quantificadas por identificação da coloração castanha dos núcleos corados, pelo método de imunohistoquímica, e automaticamente mensurados através do software Image-Pro Plus.

4.12. Dosagem de neurotransmissores em áreas do SNC

Os cérebros de camundongos foram coletados e armazenados em freezer -80°C. As regiões da amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado foram rapidamente isoladas e re-congeladas. Posteriormente, cada região foi homogeneizada individualmente por ultrassom, em uma solução de ácido perclórico 0,2M contendo cisteína 3 mM, e centrifugada a 15000 x g, à 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi coletado e injetado em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (Shimatzu, Japao) acoplado a um detector de fluorescência (fase estacionária C18; fase móvel CH₃COONa 12 mM, EDTA). Na₂ 0.26 mM, pH = 3,5; fluxo de 0,5 mL/min; detector de fluorescência, λ_{exc} 279 nm, λ_{emis} 320 nm; sensibilidade média). A concentração proteica de cada neurotransmissor, norepinefrina (NE), adrenalina (AD), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) foi expressa em ng/mg de tecido. O tempo de retenção de cada neurotransmissor depende da interação com as fases móvel e estacionária da coluna. O tempo total de cada corrida foi 30 minutos. Foram realizadas 3 corridas para cada amostra, exceto para a região da amígdala.

4.13. Dosagem de proteína

A quantidade total de proteínas foi mensurada através do *Nanodrop*, programa A210, absorvância de 2,309nm. Amostras de pulmão, foram diluídas em tampão de extração de citocinas, como etapa da determinação enzimática de células inflamatórias no pulmão (ver dosagem de enzimas EPO, MPO e NAG), e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas. Para a dosagem de neurotransmissores no córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e estriado, o pellet que foi obtido após centrifugação (ver dosagem de neurotransmissores em áreas do SNC) foi ressuspenso em 1 mL de NaOH 1M, e utilizado para quantificar as proteínas presentes na amostra. Inicialmente o aparelho reconhecia a solução diluente de cada amostra, “pura” como o branco, e em seguida 1 μ l do homogenato de cada amostra era injetado no aparelho para a quantificação das proteínas presentes na solução.

4.14. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média. A comparação entre 3 ou mais grupos foi feita por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Brown-Forsythe ou comparações múltiplas de Tukey, quando apropriado. As informações foram mencionadas na legenda das figuras. Foi considerado diferença estatisticamente significante quando $p < 0,05$. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 9.3.1).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do tratamento periférico com Ang-(1-7) sobre inflamação pulmonar e comportamento do tipo ansioso em animais submetidos ao modelo de asma

5.1.1. Tratamento com Ang-(1-7) via oral.

Inicialmente avaliamos a quantidade total de células, monócitos e eosinófilos presentes no LBA de animais imunizados e desafiados com OVA. O número total de células não foi estatisticamente diferente entre os grupos: grupo asmático ($6,37 \times 10^5 \pm 2,10$ células, $n=7$), grupo controle ($3,92 \times 10^5 \pm 1,42$ células, $n=10$), e asmático tratado com Ang-(1-7) por via oral ($5,48 \times 10^5 \pm 1,23$ células, $n=7$; Figura 10A). O mesmo foi observado na contagem de células mononucleares, onde também não houve diferença entre os grupos (Figura 10B). No entanto, os animais asmáticos apresentaram maior contagem de eosinófilos ($2,19 \times 10^5 \pm 0,69$ células, $n=7$) em relação ao grupo controle ($0,13 \times 10^5 \pm 0,09$ células, $n=10$; Figura 10C). Efeito que foi atenuado nos animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral, embora sem alcançar diferença estatística ($1,45 \times 10^5 \pm 0,57$ células, $n=7$ vs $2,19 \times 10^5 \pm 0,69$ células, $n=7$, animais asmáticos; Figura 10C).

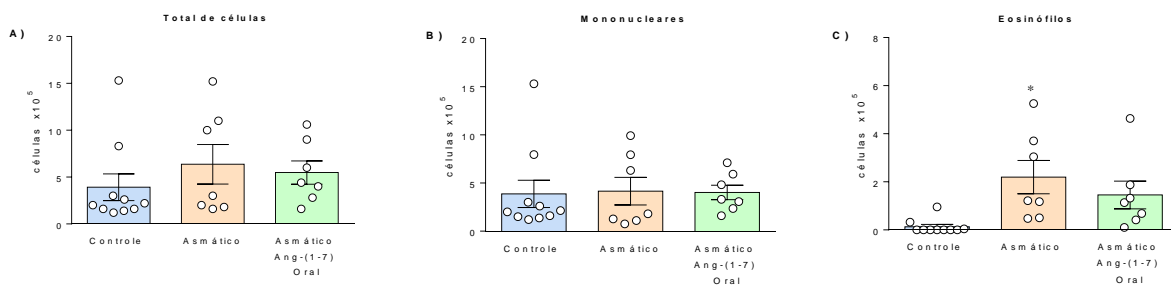


Figura 10. Contagem diferencial de células do fluido do lavado bronco-alveolar (LBA). Total de células, células mononucleares e eosinófilos em animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (Oral; $60 \mu\text{g}/\text{kg}$); $n=7-10$ por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM; * $p < 0,05$ vs controle (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Após observarmos a presença de células inflamatórias características da asma alérgica no LBA, determinamos de forma indireta o acúmulo de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no tecido pulmonar através da medida da concentração das enzimas EPO, MPO e NAG, respectivamente. A enzima EPO apresentou maior concentração no grupo asmático ($0,33 \pm 0,06$ DO/mg de proteína, $n=8$) em relação ao grupo controle ($0,06 \pm 0,00$ DO/mg de proteína, $n=10$; Figura 11A), enquanto os animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral apresentaram a atenuação ($0,13 \pm 0,01$ DO/mg de proteína, $n=7$) em relação ao grupo asmático ($0,33 \pm 0,06$ DO/mg de proteína $n=8$); Figura 11A). Confirmando que a administração oral de Ang-(1-7) foi capaz de reduzir o acúmulo de eosinófilos no tecido pulmonar. A concentração da enzima MPO foi maior no grupo asmático ($0,53 \pm 0,12$ DO/mg de proteína, $n=8$) em relação ao grupo controle ($0,06 \pm 0,00$ DO/mg de proteína; $n=10$; Figura 11B), no entanto, o tratamento com Ang-(1-7) por via oral não alterou a concentração da MPO ($0,25 \pm 0,06$ DO/mg de proteína, $n=7$; Figura 11B). Por outro lado, o tratamento de animais asmáticos com Ang-(1-7) reduziu a concentração de NAG ($0,59 \pm 0,06$ DO/mg de proteína, $n=7$ vs $0,14 \pm 0,20$ DO/mg de proteína; $n=7$; Figura 11C) em relação aos animais asmáticos, indicando redução da quantidade de macrófagos no tecido pulmonar.

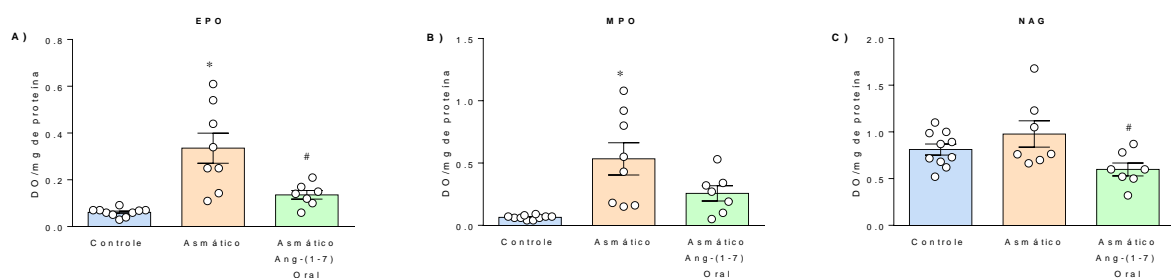


Figura 11. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (Oral; $60\mu\text{g}/\text{kg}$); $n=7-10$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Avaliamos também o infiltrado de células inflamatórias em cortes histológicos de pulmão corados em hematoxilina e eosina (HE; Figuras 12-13). A figura 12 apresenta imagens histológicas do pulmão de animais controle, asmático e asmático tratado por via oral com Ang-(1-7), coradas por HE. Os animais asmáticos (Figura 12B) exibiram infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar em comparação aos animais do grupo controle (Figura 12A). A infiltração inflamatória foi reduzida nos animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral (Figura 12C).

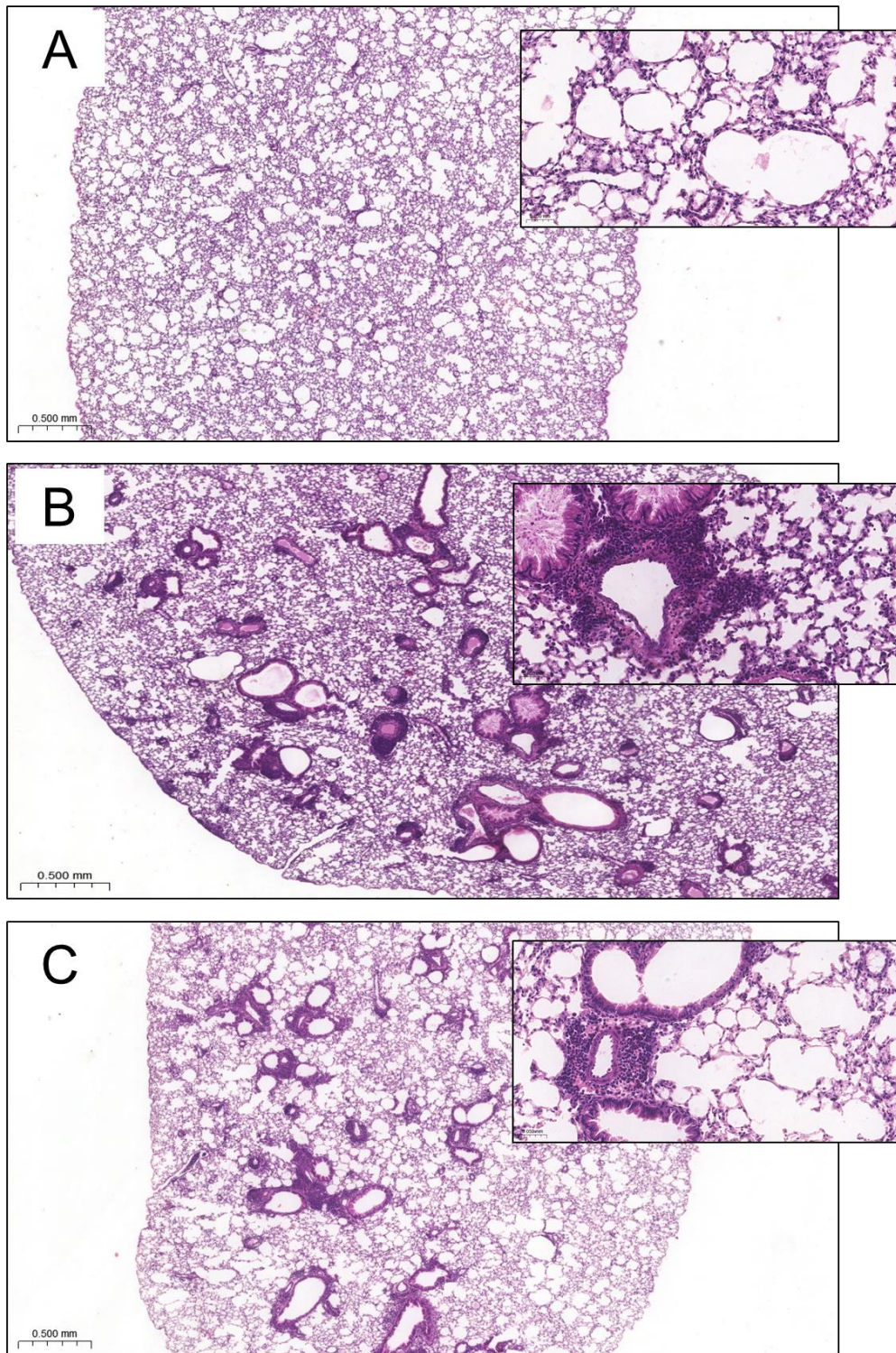


Figura 12. Imagens representativas de cortes do pulmão. As imagens foram coradas em HE, ilustrando o infiltrado inflamatório no pulmão de animais submetidos ao modelo de asma (2.3x aumento menor e 20x aumento maior), controle (A), asmático (B) e tratados com Ang-(1-7) via oral (C).

A Figura 13 apresenta a quantificação da área correspondente ao infiltrado inflamatório nos grupos estudados. Os animais asmáticos apresentaram maior área com infiltração de células inflamatórias ($10,1 \pm 0,13 \times 10^6$ pixels; Figura 13) em relação aos animais do grupo controle ($2,99 \pm 0,38 \times 10^6$ pixels). Por outro lado, o tratamento via oral com Ang-(1-7) foi capaz de atenuar a área infiltrada por células inflamatórias o ($7,4 \pm 0,25 \times 10^6$ pixels).

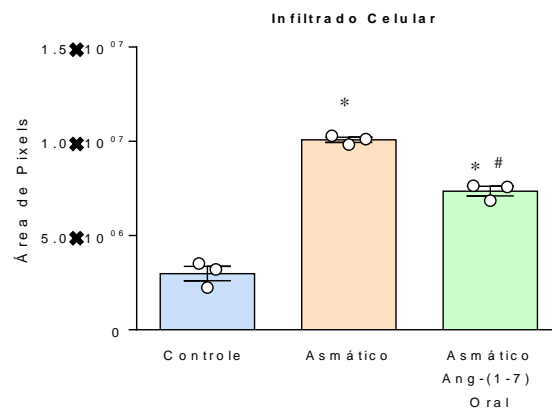


Figura 13. Determinação do infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (Oral; $60\mu\text{g}/\text{kg}$); $n=3$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

O teste de campo aberto é largamente utilizado para avaliar a atividade locomotora e comportamento do tipo ansioso. Quando os animais se movem menos, ou seja, exploram menos o ambiente, são considerados mais ansiosos. Os animais do grupo asmático apresentaram menor atividade locomotora ($450 \pm 61,09$ cm; $n=8$) quando comparados aos animais do grupo controle ($675 \pm 58,6$ cm, $n=10$; Figura 14A), indicando comportamento do tipo ansioso. Em contrapartida, os animais asmáticos que foram tratados com Ang-(1-7) por via oral apresentaram atividade locomotora ($855,7 \pm 79,46$ cm; $n=7$; Figura 14A) semelhante aos animais controles e maior do que a dos asmáticos não tratados (Figura 14A). Um outro parâmetro utilizado para avaliar o

comportamento do tipo ansioso neste teste, é contabilizar o número de vezes que este animal se levanta, apoiando-se apenas nas patas traseiras. Assim como na atividade locomotora, quanto maior o número de levantamentos (*Stand up*), menor o indicativo de comportamento tipo ansioso. No entanto, não houve diferença entre os grupos controle, asmático e asmático tratado com Ang-(1-7) por via oral com relação a este parâmetro (Figura 14B).

O teste de suspensão pela cauda é utilizado para estimar o comportamento do tipo depressivo. Inicialmente, ao serem suspensos pela cauda, os animais procuram escapar da situação que foi imposta, no entanto, sem obter sucesso os animais apresentam momentos de desistência, quando assumem uma postura imóvel. Cada período de imobilidade é cronometrado dentro de um tempo total de 5 minutos. Quanto mais tempo imóvel, ou seja, quanto mais tempo de desistência em escapar do teste, o animal é classificado como tendo comportamento do tipo depressivo. Como esperado, os animais do grupo asmático apresentaram maior tempo de imobilidade ($85,75 \pm 12,76$ seg; $n=8$) quando comparados aos animais do grupo controle ($48,2 \pm 10,22$ seg, $n=10$; Figura 14C). O tratamento de animais asmáticos com Ang-(1-7) preveniu este comportamento de desistência, e os animais deste grupo apresentaram-se mais ativos em relação aos asmáticos não tratados ($38,57$ segundos $\pm 5,89$ $n=7$; Figura 14C).

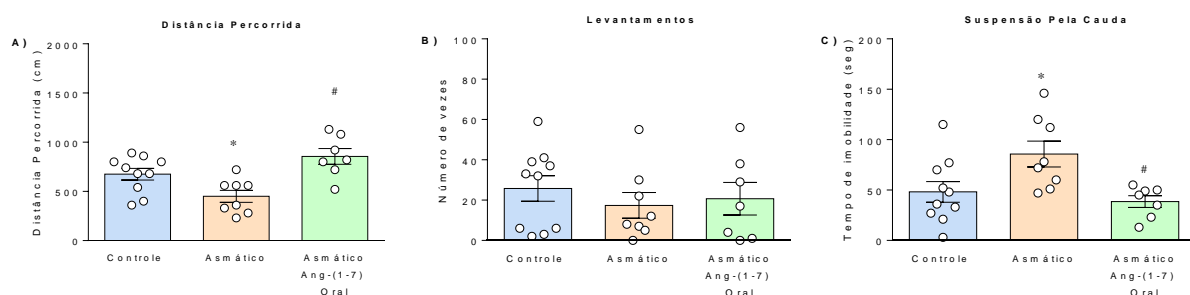


Figura 14. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda. Distância percorrida (A, cm) e número de levantamentos nas patas traseiras (B) no teste em campo aberto e tempo de imobilidade (C, seg) no teste de suspensão pela cauda de animais controle, asmáticos e asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral ($60\mu\text{g}/\text{kg}$). $n=8-10$ por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

5.1.2. Tratamento com Ang-(1-7) via intranasal.

Em outros animais, avaliamos o efeito do tratamento via intranasal com Ang-(1-7) na inflamação pulmonar e comportamentos do tipo ansioso/depressivo. Nesta nova comparação observamos que os animais asmáticos apresentaram aumento na quantidade total de células ($3,35 \times 10^5 \pm 0,51$ células, $n=9$) em relação ao grupo controle ($0,74 \times 10^5 \pm 0,12$ células, $n=7$) que foi prevenido pelo tratamento com Ang-(1-7) por via intranasal ($1,36 \times 10^5 \pm 0,28$ células, $n=10$; Figura 15A). Quando avaliamos a quantidade de células mononucleares, os animais asmáticos não apresentaram diferença em relação ao grupo controle ($1,08 \times 10^5 \pm 0,17$ células, $n=8$ vs $0,8 \times 10^5 \pm 0,13$ células, $n=6$; Figura 15B). Por outro lado, os animais tratados via intranasal apresentaram redução da quantidade de células mononucleares ($0,60 \times 10^5 \pm 0,09$ células, $n=9$) em relação ao grupo de animais não tratados (Figura 15B). Como o esperado, os animais asmáticos apresentaram maior contagem de eosinófilos ($2,39 \times 10^5 \pm 0,41$ células, $n=8$) em relação ao grupo controle ($0 \times 10^5 \pm 0$ células, $n=6$; Figura 15C). Efeito que foi abolido nos animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via intranasal ($0,61 \times 10^5 \pm 0,23$ células, $n=7$ vs $2,19 \times 10^5 \pm 0,69$ células, $n=7$, animais asmáticos; Figura 15C).

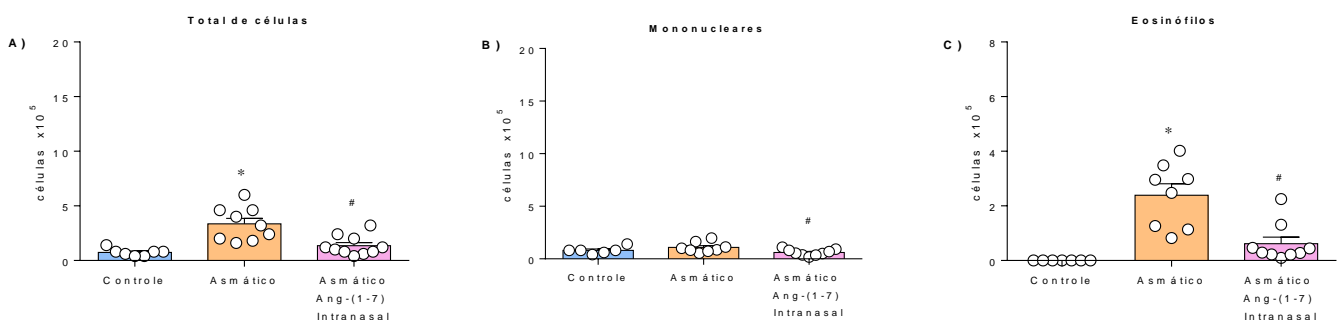


Figura 15. Contagem diferencial de células do fluido do lavado bronco-alveolar (LBA). Total de células, células mononucleares e eosinófilos em animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; 30µg/ kg); $n=7-9$ por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM; * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Os animais asmáticos apresentaram maior concentração de EPO no pulmão ($0,14 \pm 0,02$ DO/mg de proteína, n=11) em relação ao grupo controle ($0,06 \pm 0,01$ DO/mg de proteína, n= 12; Figura 16A), que foi atenuado pelo tratamento com Ang-(1-7) via intranasal ($0,07 \pm 0,01$ DO/mg de proteína, n=10). Este resultado corrobora dados anteriores de nosso grupo e mostram que a administração intranasal de Ang-(1-7) foi capaz de reduzir o acúmulo de eosinófilos, tanto no pulmão quanto no LBA. A concentração da enzima MPO foi maior no grupo asmático ($0,22 \pm 0,05$ DO/mg de proteína, n=11) em relação ao grupo controle ($0,04 \pm 0,00$ DO/mg de proteína; n=12; Figura 16B). Já o tratamento com Ang-(1-7) por via intranasal não alterou significativamente a concentração da MPO ($0,12 \pm 0,02$ DO/mg de proteína, n=10; Figura 16B). O tratamento de animais asmáticos com Ang-(1-7) intranasal, da mesma forma que o tratamento por via oral, reduziu a concentração de NAG ($0,06 \pm 0,01$ DO/mg de proteína, n=10) em relação aos animais asmáticos ($0,27 \pm 0,08$ DO/mg de proteína; n=7; Figura 16C), indicando que as duas vias periféricas podem reduzir a quantidade de macrófagos no tecido pulmonar.

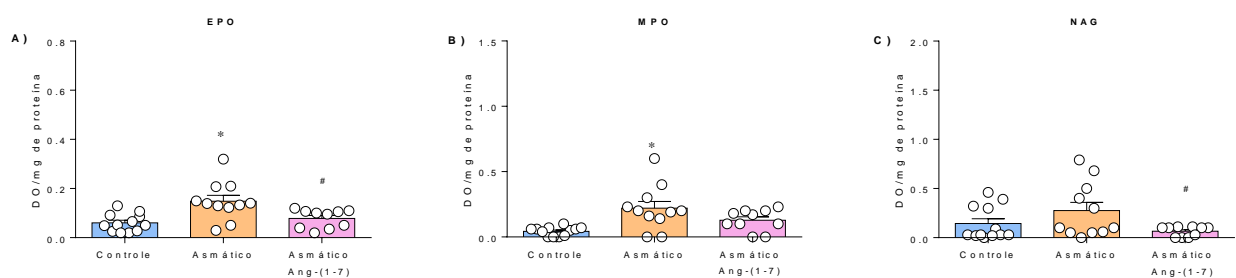


Figura 16. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; 30µg/ kg); n=10-12. Os resultados estão expressos como média ± EPM. *p< 0,05 vs controle e # p< 0,05 vs asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

A Figura 17 ilustra o grau de infiltrado inflamatório em cortes de pulmão de animais controle, asmático e tratado com Ang-(1-7) via intranasal. Semelhante ao tratamento por via oral,

os animais que foram tratados com Ang-(1-7) por via intranasal apresentaram menor infiltrado inflamatório no pulmão.

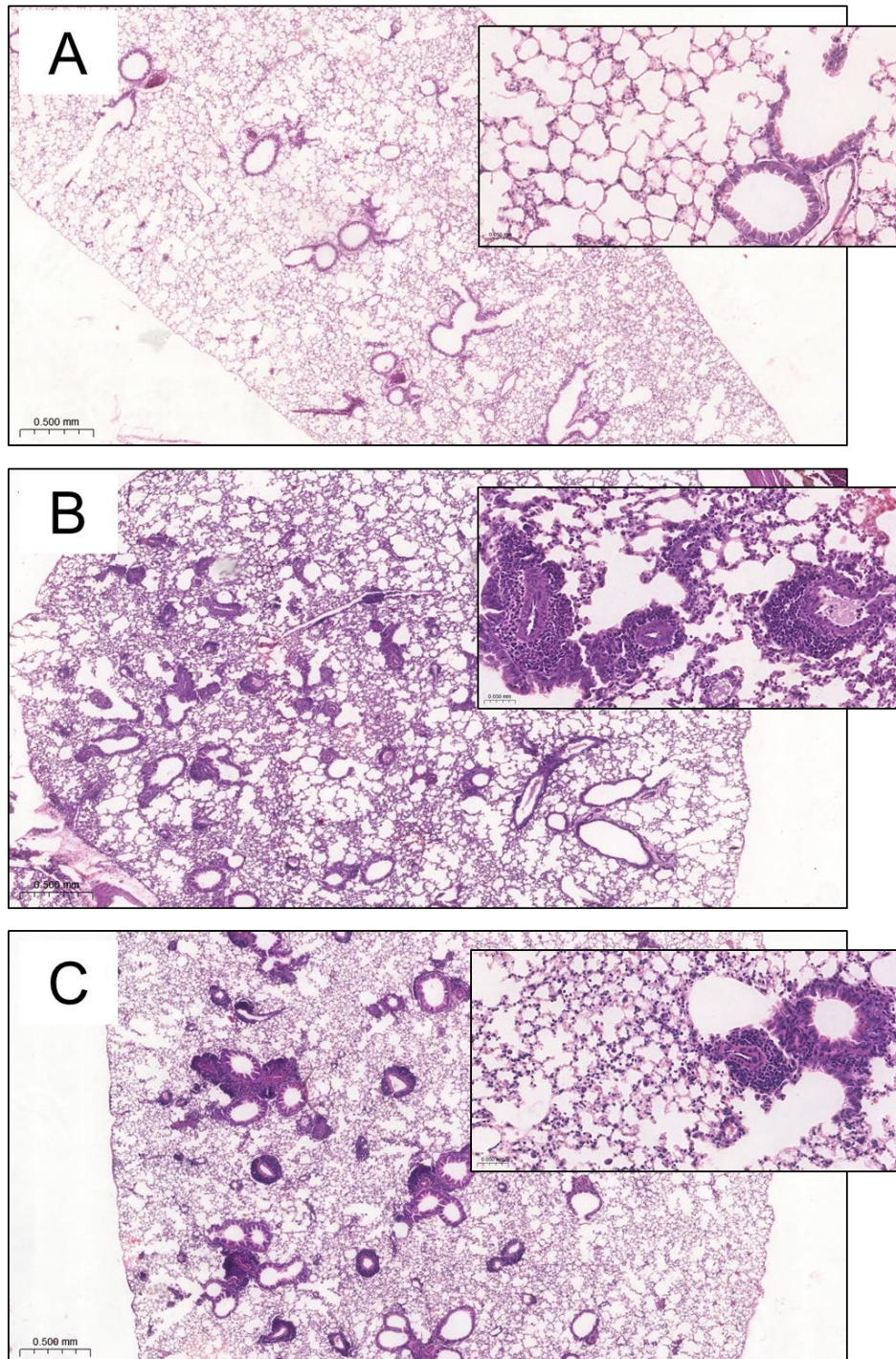


Figura 17. Imagens representativas de cortes de pulmão. As imagens foram coradas em HE, ilustrando o infiltrado inflamatório no pulmão de animais submetidos ao modelo de asma (2.3x aumento menor e 20x aumento maior). Animais controle (A), asmático (B), tratados com Ang-(1-7) por via intranasal (C).

Como observado no protocolo anterior, os animais asmáticos apresentaram maior infiltrado inflamatório ($7,9 \pm 0,47 \times 10^6$ pixels; Figura 18) em relação aos animais do grupo controle ($2,3 \pm 0,73 \times 10^6$ pixels). O tratamento, por via intranasal, com Ang-(1-7) atenuou a área de infiltrado inflamatório ($3,7 \pm 0,9 \times 10^6$ pixels) em relação aos animais asmáticos não tratados (Figura 18).

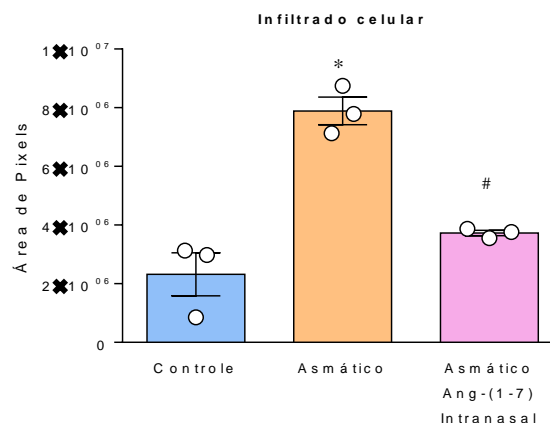


Figura 18. Infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$); $n=3$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Avaliamos também o efeito do tratamento intranasal com Ang-(1-7) sobre o comportamento do tipo ansioso no teste de campo aberto. O tratamento com Ang-(1-7) intranasal preveniu a redução de motilidade ($1163 \pm 67,58$ cm, $n=10$) observada nos animais asmáticos ($646,7 \pm 74,6$ cm, $n=12$ vs $982,5 \pm 97,36$ cm, $n=12$, controle; Figura 19A).

O número de levantamentos não foi diferente entre os grupos controle e asmático, mas de forma curiosa, os animais tratados por via intranasal ($32,5 \pm 3,29$ levantamentos, $n=10$) ficaram apoiados somente nas patas traseiras, mais vezes do que os animais asmáticos ($14 \pm 3,4$ levantamentos, $n=12$) ou controle ($12,55 \pm 3,40$ levantamentos, $n=12$; Figura 19B). No teste de suspensão pela cauda, os animais asmáticos ($64,58 \pm 7,41$ seg, $n=12$) apresentaram mais tempo de

desistência em relação aos animais controle ($29,17 \pm 5,41$ seg, $n=12$), e o tratamento com Ang-(1-7) intranasal preveniu o aumento do tempo de imobilidade ($23,9 \pm 4,71$ seg, $n=10$) em relação ao tempo observado nos animais asmáticos ($64,58 \pm 7,41$ seg, $n=12$; Figura 19C), indicando que a Ang-(1-7) intranasal também permitiu que os animais ficassem mais ativos.

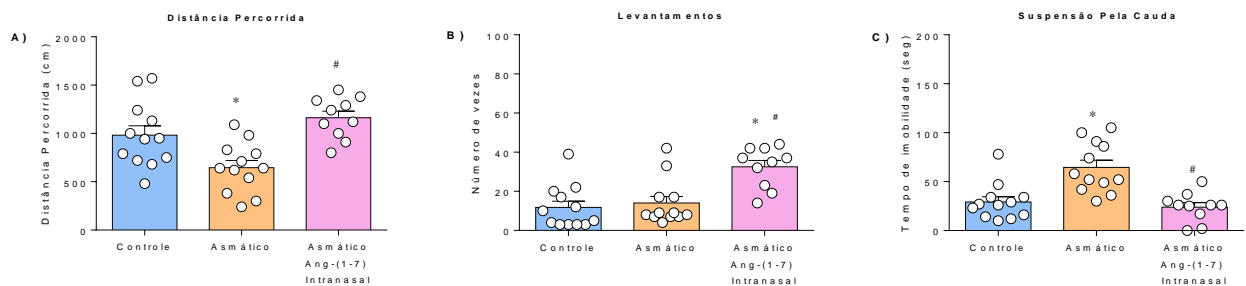


Figura 19. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda. Distância percorrida (A, cm) e número de levantamentos nas patas traseiras (B) no teste em campo aberto e tempo de imobilidade (C, seg) no teste de suspensão pela cauda de animais controle, asmáticos e asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via intranasal ($30\mu\text{g}/\text{kg}$). $n=10-12$ por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

Avaliamos o peso dos animais dos grupos experimentais no primeiro dia de protocolo experimental (dia 0) e no dia da coleta de tecidos (21^o dia). Não houve diferença significativa do peso inicial e final entre os animais dos grupos controle, asmático e asmático tratado por via oral com Ang-(1-7) (Figura 20A) ou asmático tratado por via intranasal (Figura 20B).

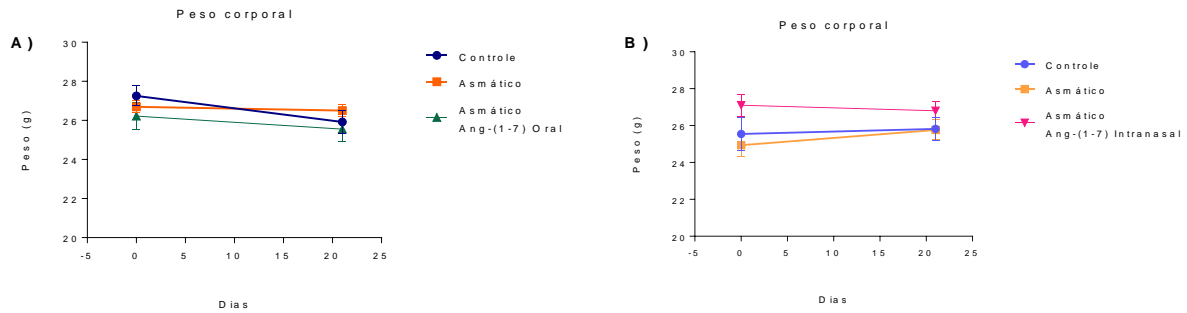


Figura 20. Peso dos animais submetidos ao modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (Oral; 60 μ g/ kg) (Figura A) ou intranasal (Intranasal; 30 μ g/ kg) (Figura B); n=10-12.

5.2. Efeito do comportamento do tipo ansioso e inflamação pulmonar em animais com deleção do receptor Mas submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.

A seguir, avaliamos o comportamento ansiogênico e a inflamação pulmonar em animais com deleção do receptor da Ang-(1-7), Mas (Mas KO), submetidos ao modelo experimental de asma alérgica. Como esperado, animais sem a deleção do receptor Mas (C57BL/6J -WT) asmáticos apresentaram maior quantidade total de células ($5,36 \times 10^5 \pm 0,47$ células, n=5) em relação aos grupos controle WT ($0,6 \times 10^5 \pm 0,08$ células, n=4; Figura 21A) e MasKO controle ($0,6 \times 10^5 \pm 0,81$ células, n=4; Figura 21A). Não foi encontrado diferenças na quantidade de células mononucleares, entre os grupos experimentais (Figura 21B). Maior quantidade de eosinófilos foi observada tanto nos WT asmáticos ($3,03 \times 10^5 \pm 0,44$ células, n=5 vs $0,0 \times 10^5 \pm 0,0$ células, n=4, WT controle); como nos MasKO asmáticos ($1,91 \times 10^5 \pm 0,39$ células, n=4 vs $0,0 \times 10^5 \pm 0,00$ células, n=4, Mas KO controle; Figura 21C).

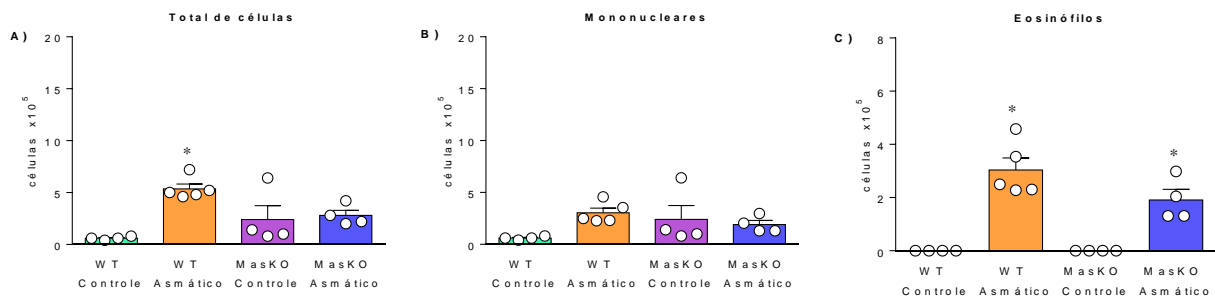


Figure 21. Contagem de células no fluido do lavado bronco-alveolar. Animais selvagens controle (WT Controle), nocautes para receptor Mas controle (MasKO Controle), asmáticos selvagens (WT Asmático) nocautes asmáticos (MasKO Asmático). $n=4-5$ por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM; $*p < 0.05$ em relação ao respectivo controle (WT ou MasKO); (One-Way ANOVA seguido do teste comparações múltiplas de Tukey).

Como o esperado, nos animais WT asmáticos a concentração de EPO, apresentou-se mais elevada em relação ao seu respectivo controle ($0,03 \pm 0,00$ DO/mg de proteína células, $n=5$; vs $0,01 \pm 0,00$ DO/mg de proteína; $n=4$, Controle WT; Figura 22A). Da mesma forma, foram estatisticamente maiores nos WT asmáticos a concentração de MPO ($0,01 \pm 0,00$ DO/mg de proteína, $n=5$; vs $0,00 \pm 0,00$ DO/mg de proteína; $n=4$, WT controle; Figura 22B) e NAG ($0,07 \pm 0,00$ DO/mg de proteína; $n=5$ vs $0,03 \pm 0,00$ DO/mg de proteína; $n=14$, no grupo controle; Figura 22C). No entanto, nos Mas KO a concentração de EPO, MPO e NAG não foi estatisticamente diferente dos valores dos animais Mas KO controle (Figura 22A-C). Além disso a concentração de EPO, MPO e NAG nos animais WT asmáticos foi maior do que a dos animais Mas KO asmáticos (Figura 22A- C). Observou-se nestes animais também que a concentração das enzimas nos animais WT foi 4-6 vezes menor do que camundongos da linhagem Balb-c, controle dos protocolos anteriores.

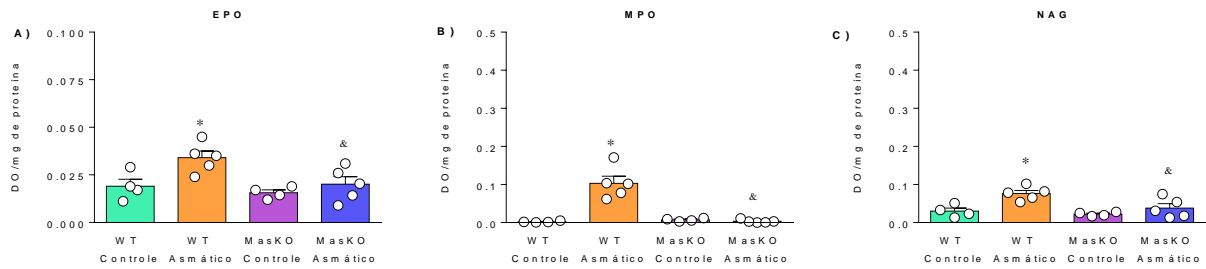


Figura 22. Concentração das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO, A), mieloperoxidase (MPO, B) e N-acetilglucosaminidase (NAG, C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais selvagens controles (WT Controle), nocautes controles (MasKO Controle), selvagens asmáticos (WT Asmático) e nocautes asmáticos (MasKO Asmático). $n=4-5$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ em relação ao respectivo controle e & $p < 0,05$ em relação ao WT Asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

A Figura 23 apresenta os cortes histológicos do pulmão de animais selvagens e com a deleção do receptor Mas. A área com infiltrado inflamatório foi maior nos animais asmáticos. No entanto, na quantificação das imagens, figura 24, não observamos diferença estatística entre os grupos.

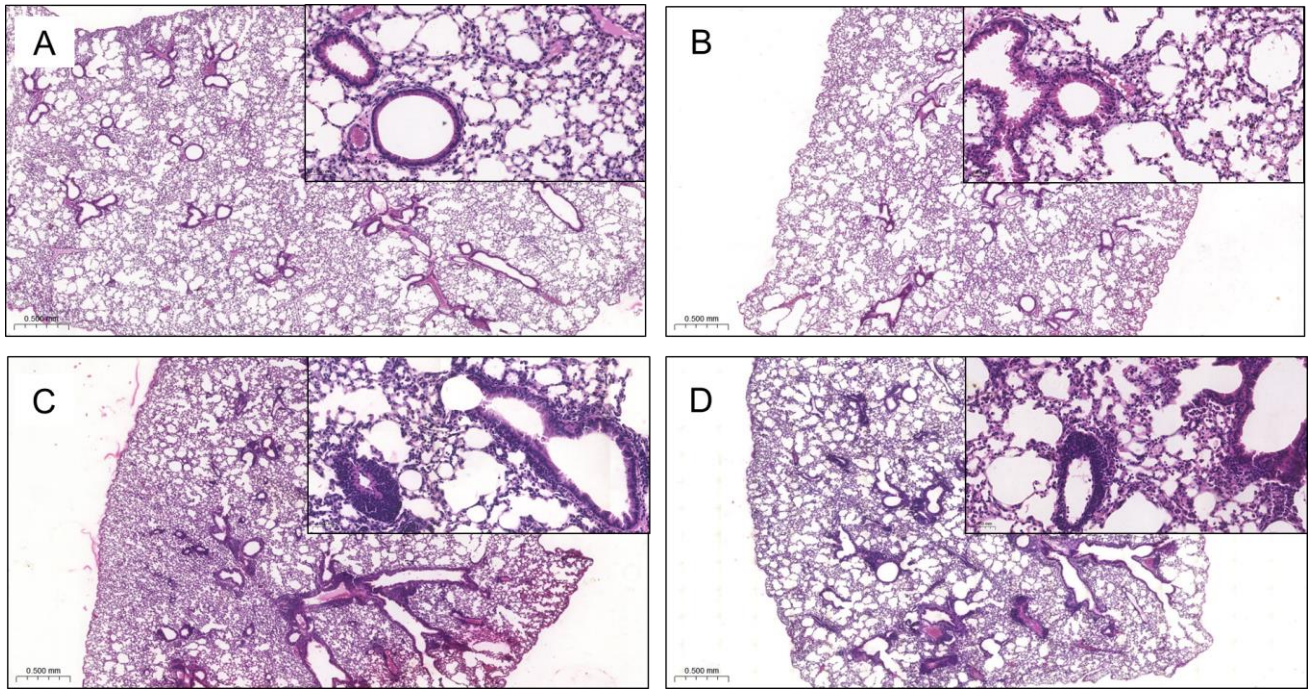


Figura 23. Cortes histológicas do pulmão de animais submetidos ao protocolo experimental de asma. As imagens foram coradas em HE, ilustrando o infiltrado inflamatório no pulmão de animais submetidos ao modelo de asma (2.3x aumento menor e 20x aumento maior). Animais selvagem controle (WT Controle, A), um nocaute controle (MasKO Controle, B), um selvagem asmático (WT Asmático, C) e um nocaute asmático (MasKO Asmático, D).

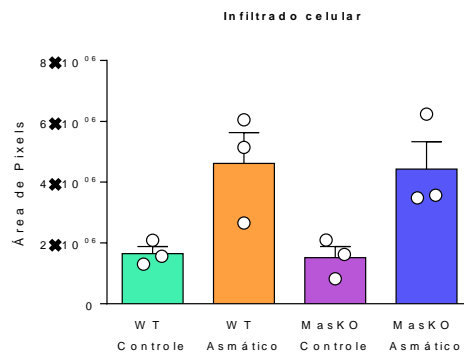


Figura 24. Determinação do infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais selvagens controle (WT Controle), nocautes controle (MasKO Controle), selvagens asmáticos (WT Asmático) e nocautes asmáticos (MasKO Asmático); n=3.

Com relação ao teste em campo aberto, apenas os animais asmáticos com deleção do receptor Mas apresentaram redução de mobilidade em comparação aos animais do grupo controle ($340 \pm 21,68$ cm, n=5, asmático MasKO vs $882,5 \pm 104,5$ cm, nos controle MasKO, n=4; Figura 25A) e mesmo em relação ao WT controle ($805 \pm 138,4$ cm, nos controle WT, n=4). Nenhuma

alteração no parâmetro “stand up” foi observada entre os grupos (Figura 25B). No teste de suspensão pela cauda, o tempo de imobilidade foi maior tanto para os animais asmáticos WT ($83,8 \pm 2,99$ seg, $n=5$, WT Asmático vs $47,00 \pm 6,12$ seg, $n=4$, WT Controle; Figura 25C) como para os asmáticos MasKO ($86,2 \pm 11,17$ seg, $n=5$ vs $37,25 \pm 2,56$ seg, $n=4$, Mas KO Controle; Figura 17C). O tempo de imobilidade dos MasKO asmáticos foi semelhante ao dos WT asmáticos (Figura 25C).

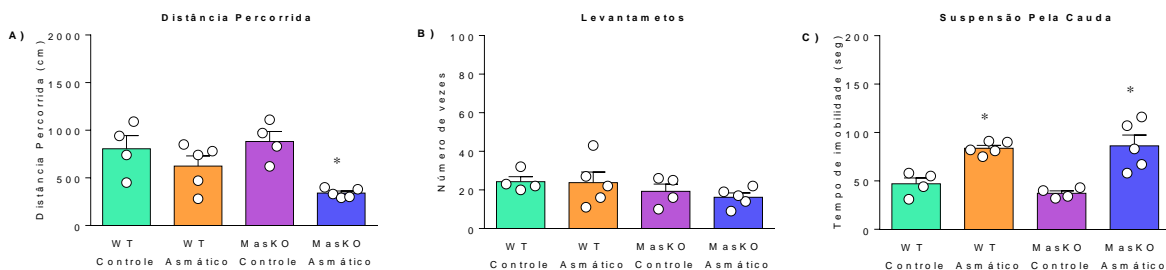


Figura 25. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda. Distância percorrida (A, cm) e número de levantamentos nas patas traseiras (B) no teste em campo aberto e tempo de imobilidade (C, seg) no teste de suspensão pela cauda de animais selvagens controle (WT Controle), nocautes controles (MasKO Controle), selvagens asmáticos (WT Asmático) e nocautes asmáticos (MasKO Asmático); $n=4-5$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ em relação ao respectivo controle (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey).

Não houve diferença no peso dos diferentes grupos de animais WT e com deleção do receptor Mas, não variaram no início ou final do protocolo (Figura 26).

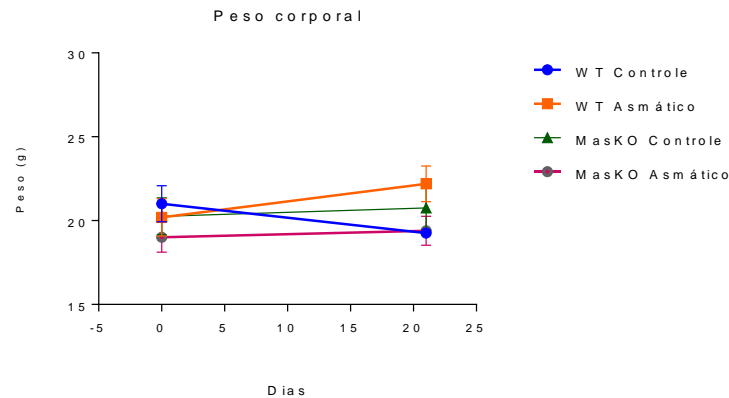


Figura 26. Peso dos animais selvagens e nocautes submetidos ao modelo experimental de asma alérgica n=4-5.

5.3. Efeito do tratamento ICV com Ang-(1-7) sobre inflamação pulmonar e comportamento do tipo ansioso em animais submetidos modelo de asma

A seguir, avaliamos se o tratamento ICV com Ang-(1-7) poderia alterar comportamento ansiogênico e a inflamação pulmonar em animais submetidos ao modelo de asma. Como esperado, animais asmáticos apresentaram aumento do número total de leucócitos no LBA ($3,35 \times 10^5 \pm 0,51$ células, n=9; Figura 27A) em comparação ao grupo controle ($0,57 \times 10^5 \pm 0,14$ células, n=9; Figura 27A). O tratamento ICV com Ang-(1-7) preveniu o aumento do número total de leucócitos no LBA ($0,60 \times 10^5 \pm 0,11$ células, n=7). Com relação a quantidade de células mononucleares, o grupo asmático ($1,08 \times 10^5 \pm 0,17$ células, n=8) não foi estatisticamente diferente do grupo controle ($0,80 \times 10^5 \pm 0,13$ células, n=6), no entanto, os animais tratados com Ang-(1-7) ICV ($0,29 \times 10^5 \pm 0,04$ células, n=7; Figura 27B) apresentaram atenuação do número de células em relação aos animais do grupo asmático não tratado.

A quantidade superior de eosinófilos no grupo asmático ($2,39 \times 10^5 \pm 0,41$ células, n=8) em relação ao grupo controle ($0,00 \times 10^5 \pm 0,00$ células, n=9), também foi prevenida pelo tratamento com Ang-(1-7) ICV, representando uma importante atenuação dessas células inflamatórias ($0,30 \times 10^5 \pm 0,09$ células, n=6; Figura 27C).

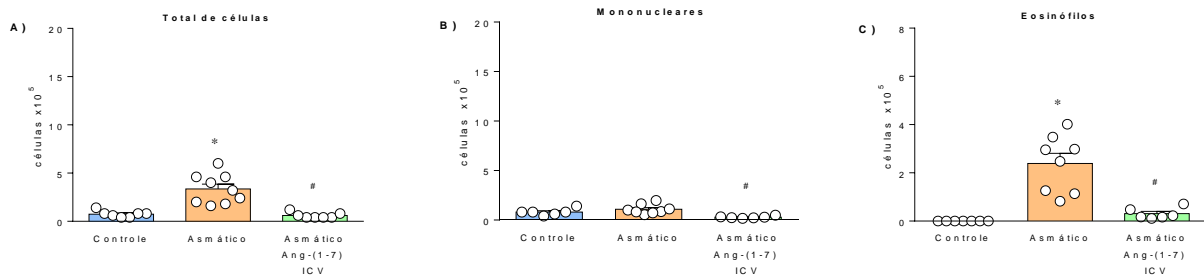


Figura 27. Contagem diferencial de células no fluido do lavado bronco-alveolar em animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via ICV (50 ng/h); n=7-10 por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM; *p < 0,05 vs controle, #p < 0,05 em relação ao asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Os animais asmáticos apresentaram aumento de eosinófilos e neutrófilos no pulmão, avaliado respectivamente pela concentração de EPO ($0,14 \pm 0,02$ DO/mg de proteína; n=11 vs $0,06 \pm 0,01$ DO/mg de proteína; n=12, no grupo controle; Figura 28A) e MPO ($0,22 \pm 0,05$ DO/mg de proteína; n=11 vs $0,04 \pm 0,00$ DO/mg de proteína; n=12, no grupo controle; Figura 28B). O tratamento com Ang-(1-7) ICV não alterou significativamente a concentração de EPO ($0,10 \pm 0,02$ DO/mg de proteína células, n=10; Figura 28A) ou MPO ($0,28 \pm 0,04$ DO/mg de proteína; n=10; Figura 28B) em relação aos animais não tratados, no entanto, os valores de EPO e MPO também não foram diferentes dos animais controle (Figura 28A e B). A presença de macrófagos, avaliada pela concentração de NAG, não foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais (Figura 28C).

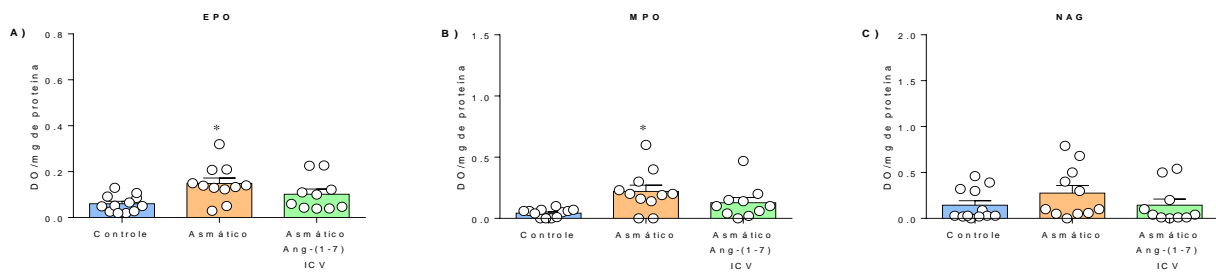


Figura 28. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. n=10-12. Animais controle, asmáticos e animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via intracerebroventricular (50ng/h). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs controle (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

A figura 29, apresenta cortes histológicos do pulmão de animais controle, asmáticos e asmáticos que receberam tratamento com Ang-(1-7) via ICV, ilustrando o infiltrado inflamatório. Como observados nos grupos anteriores deste trabalho, a quantificação do infiltrado inflamatório por histologia mostrou maior intensidade nos animais asmáticos ($7,9 \pm 0,47 \times 10^6$ pixels; Figura 30) em relação aos animais do grupo controle ($2,3 \pm 0,7 \times 10^6$ pixels; Figura 30). No entanto, o tratamento via ICV com Ang-(1-7) não alterou significativamente a área de infiltrado inflamatório ($5,7 \pm 0,3 \times 10^6$ pixels; Figura 30) em relação aos animais asmáticos não tratados.

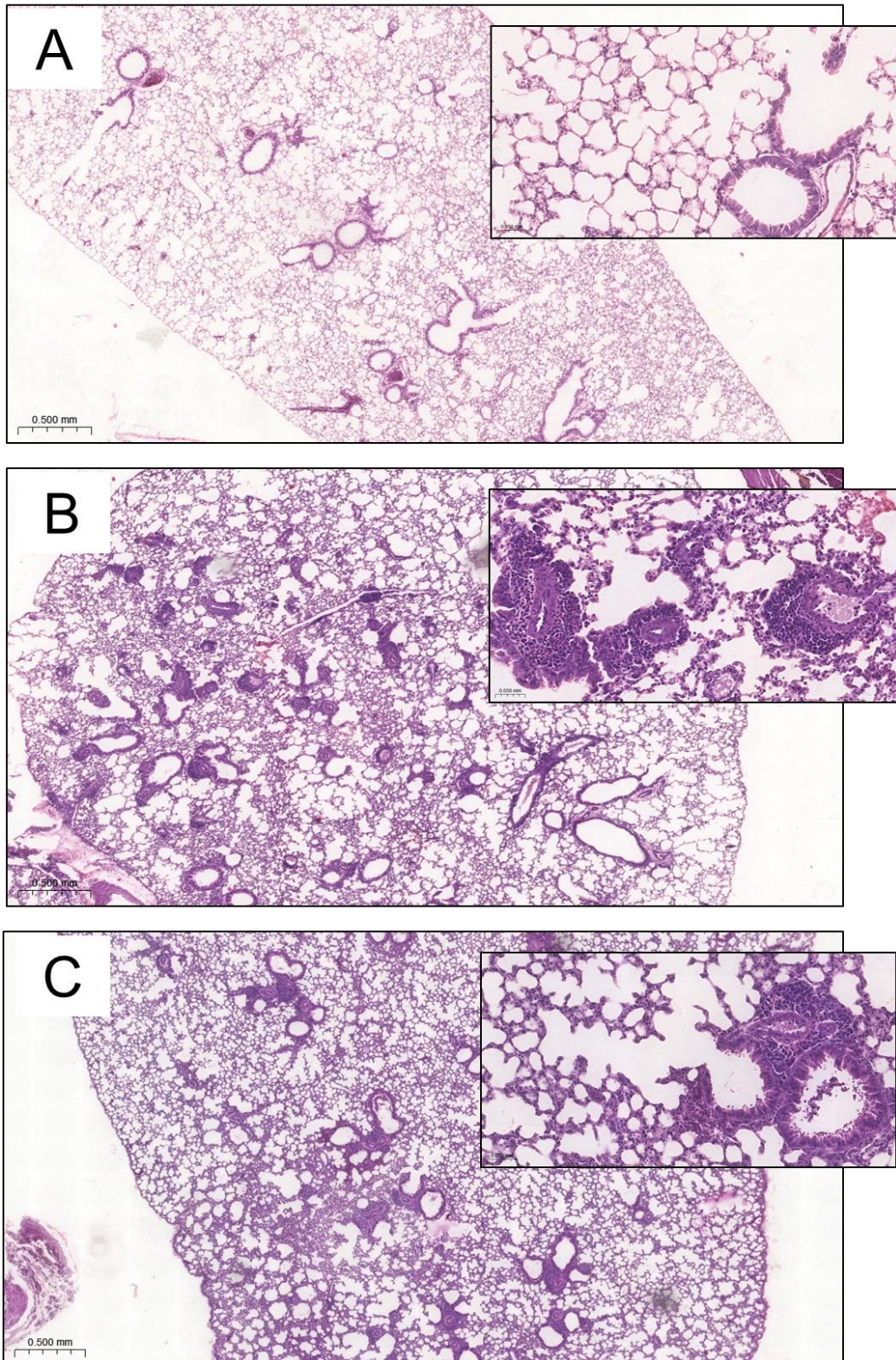


Figura 29. Imagens representativas de cortes do pulmão. As imagens foram coradas em HE, ilustrando o infiltrado inflamatório no pulmão de animais submetidos ao modelo de asma (2.3x aumento menor e 20x aumento maior). Estão representados animais controle (A), asmáticos (B) e tratados com Ang-(1-7) via ICV (C).

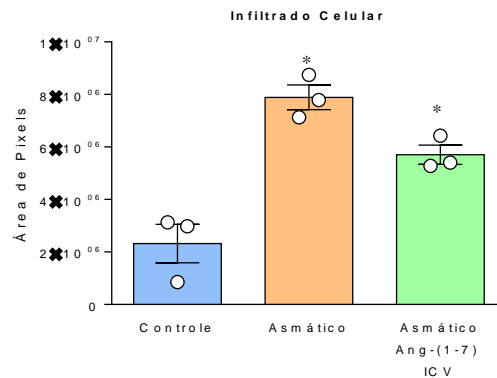


Figura 30. Infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via ICV (50ng/h); n=3 por grupo. Os resultados estão expressos como média ± EPM; *p< 0,05 vs controle (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Com relação ao teste em campo aberto, o tratamento ICV com Ang-(1-7) preveniu a redução da atividade locomotora ($1074 \pm 116,6$ cm, n=10) observada nos animais asmáticos ($646,7 \pm 74,6$ cm, n=12; Figura 31A). A atividade locomotora dos animais Ang-(1-7) ICV também não foi diferente dos animais do grupo controle ($982,5 \pm 97,36$ cm, n=12; Figura 31A). Não foi observado alteração do parâmetro “stand up” entre os grupos (Figura 31B). No teste de suspensão pela cauda, os animais do grupo asmático apresentaram maior tempo de imobilidade ($64,58 \pm 7,41$ seg, n=12; Figura 31C) quando comparados aos animais do grupo controle ($29,17 \pm 5,41$ seg, n=12). Os animais tratados com Ang-(1-7) ICV apresentaram-se mais ativos ($33,8 \pm 5,92$ seg, n=10) em relação aos asmáticos não tratados ($64,58 \pm 7,41$ seg, n=12; Figura 31C). Estes resultados confirmam resultados de estudos anteriores, que mostram que a administração ICV de Ang-(1-7) promove efeito ansiolítico, e estendem esse resultado para animais submetidos a modelo experimental de asma.

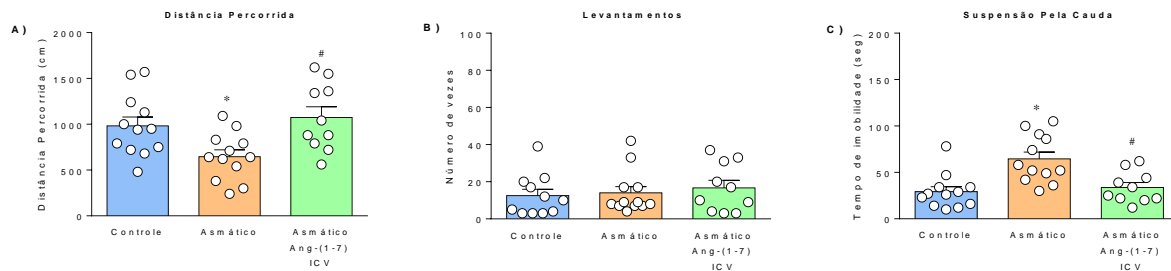


Figura 31. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda. Distância percorrida (A, cm) e número de levantamentos nas patas traseiras (B) no teste em campo aberto e tempo de imobilidade (C, seg) no teste de suspensão pela cauda de animais controle, asmáticos e asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via ICV (50ng/h). n=10-12 por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

O peso dos animais controle, asmático e asmático tratado por ICV com Ang-(1-7), não apresentou diferença estatística significativa no primeiro ou último dia do protocolo experimental (Figura 32).

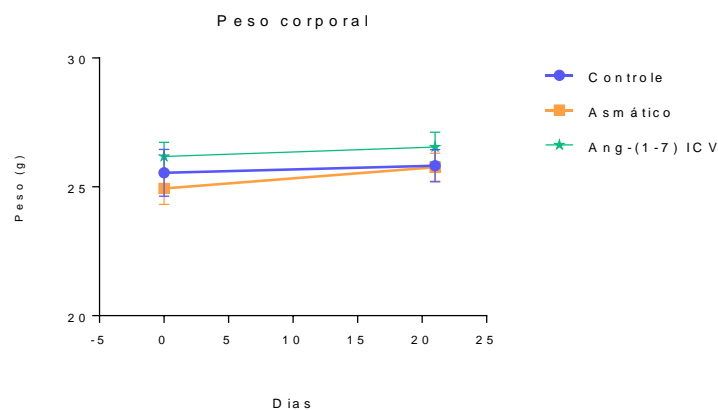


Figura 32. Peso dos animais submetidos ao modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) via ICV (50ng/h). n=10-12 por grupo.

5.4. Efeito do tratamento ICV com A-779, antagonista seletivo da Ang-(1-7), sobre inflamação pulmonar e comportamento do tipo ansioso de animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral ou intranasal.

5.4.1. Tratamento com Ang-(1-7) via oral e A-779 ICV.

Para verificar se parte do efeito ansiolítico da Ang-(1-7) administrada por via oral era mediado centralmente, outro grupo de animais foram tratados com Ang-(1-7) oral e infundidos com A-779 via ICV. Não houve diferenças quanto ao número de total de células (Figura 33A) e mononucleares (Figura 33B) para nenhum dos grupos analisados. Como esperado, os animais asmáticos apresentaram maior quantidade de eosinófilos ($2,30 \times 10^5 \pm 0,37$ células, $n=15$) em relação aos controles ($0,06 \times 10^5 \pm 0,05$ células, $n=19$; Figura 33C). Também de acordo com o resultado apresentado anteriormente, os animais tratados por via oral com Ang-(1-7) mostraram atenuação da quantidade de eosinófilos no LBA ($0,92 \times 10^5 \pm 0,26$ células, $n=6$). O bloqueio do receptor Mas, com a infusão ICV de A-779, não alterou significativamente o efeito do tratamento via oral com Ang-(1-7) sobre o número de eosinófilos ($0,50 \times 10^5 \pm 0,08$ células, $n=9$). Por outro lado, os animais asmáticos não tratados e submetidos a infusão ICV de apresentaram níveis de eosinófilos ($1,47 \times 10^5 \pm 0,54$ células, $n=7$) semelhante aos animais asmáticos ($2,30 \times 10^5 \pm 0,37$ células, $n=15$; Figura 33C).

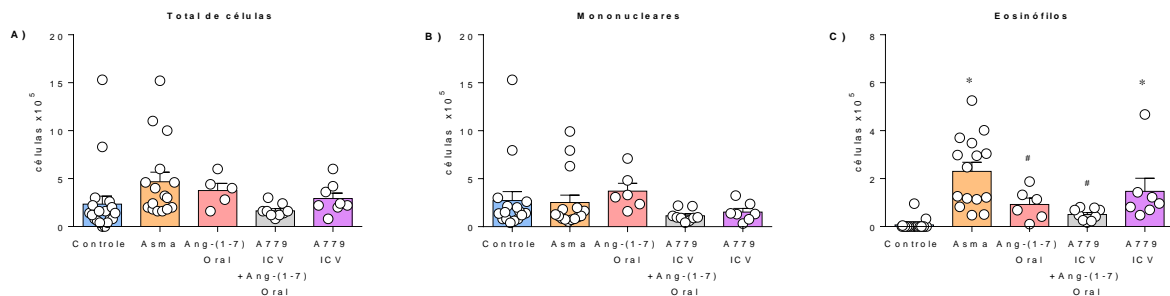


Figura 33. Contagem diferencial de células do fluido do lavado bronco-alveolar (LBA). Total de células, eosinófilos e células mononucleares em animais controle, asmáticos, animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (Oral; 60 μ g/ kg), Ang-(1-7) por via oral (Oral; 60 μ g/ kg) + A-779 ICV (200 ng/h) e A-779 ICV (200 ng/h); $n=5-19$ por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM; * $p < 0,05$ vs controle # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Como esperado os animais asmáticos apresentaram maiores valores de EPO ($0,22 \pm 0,03$ DO/mg de proteína, $n=19$; Figura 34A) e MPO ($0,33 \pm 0,06$ DO/mg de proteína, $n=20$; Figura 27B) em relação aos controles (Figura 34A e 27B). Os níveis de EPO nos animais tratados com Ang-(1-7) que receberam infusão de A-779 ICV ($0,22 \pm 0,02$ DO/mg de proteína, $n=12$; Figura 34A) foi semelhante a dos animais asmáticos não tratados. Curiosamente, os animais asmáticos que receberam apenas A-779 via ICV apresentaram atenuação de MPO ($0,12 \pm 0,02$ DO/mg de proteína, $n=11$) em relação aos asmáticos não tratados ($0,33 \pm 0,06$ DO/mg de proteína, $n=20$; Figura 34B). Ainda de forma inesperada, os animais asmáticos que receberam apenas A-779 central ($0,02 \pm 0,00$ DO/mg de proteína, $n=11$; Figura 34C) e os que receberam ICV A-799 e foram tratados com Ang-(1-7) por via oral ($0,03 \pm 0,00$ DO/mg de proteína, $n=12$), apresentaram atenuação da concentração de NAG em relação aos animais do grupo controle ($0,44 \pm 0,08$ DO/mg de proteína, $n=22$), asmático ($0,52 \pm 0,10$ DO/mg de proteína, $n=19$) e tratados com Ang-(1-7) por via oral ($0,47 \pm 0,00$ DO/mg de proteína, $n=9$; Figura 34C).

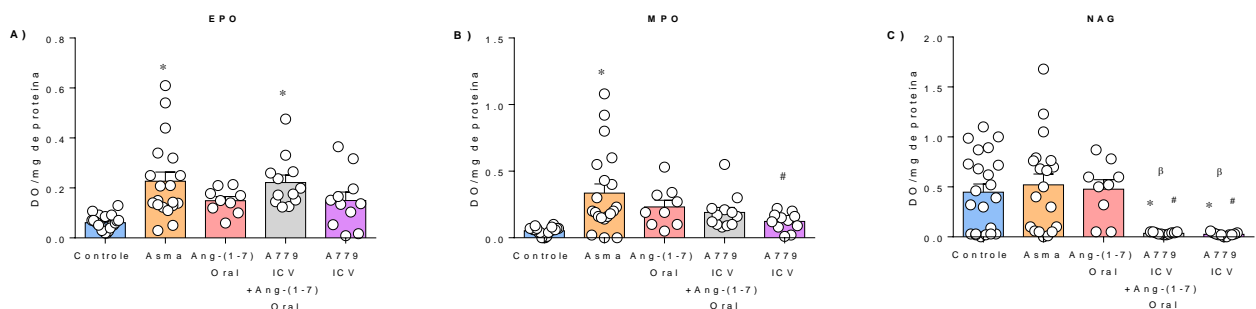


Figura 34. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos (Asma), animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (Oral; 60µg/ kg) ou Ang-(1-7) por via oral (Oral; 60µg/ kg) associado a A-779 ICV (200 ng/h) e A-779 ICV (200 ng/h); $n=11-22$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs asmático e $\beta p < 0,05$ vs Ang-(1-7) oral (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

A figura 35 apresenta cortes histológicos do pulmão de animais dos grupos experimentais corados por H&E ilustrando o infiltrado inflamatório.

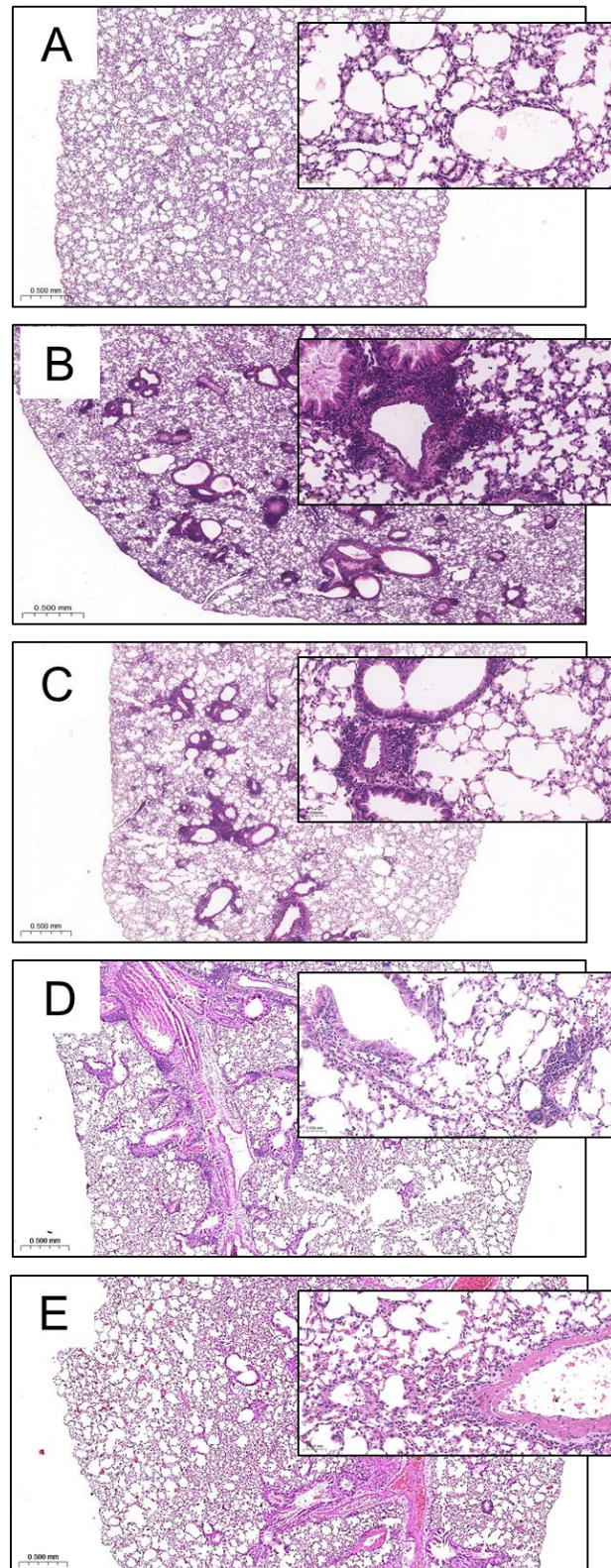


Figura 35. Cortes histológicos do pulmão de animais submetidos ao protocolo experimental de asma. As imagens foram coradas em HE, ilustrando o infiltrado inflamatório no pulmão de animais submetidos ao modelo de asma (2.3x aumento menor e 20x aumento maior). Controle (A); asmático (B); asmático tratado com Ang-(1-7) por via oral (C); asmático tratado com Ang-(1-7) via oral e A-779 ICV; (D) asmático tratado com A-779 ICV (E).

Como esperado, a área do infiltrado inflamatório foi maior em animais asmáticos ($8,98 \pm 0,54 \times 10^6$ pixels) em relação aos animais do grupo controle ($2,65 \pm 0,4 \times 10^6$ pixels) e o tratamento via oral com Ang-(1-7) atenuou a área infiltrada ($5,2 \pm 1,3 \times 10^6$ pixels). No entanto, o bloqueio central com A-779 em animais tratados por via oral com Ang-(1-7) não alterou a melhora apresentada pelo tratamento via oral ($3,5 \pm 0,9 \times 10^6$ pixels). Já os animais asmáticos que receberam apenas a infusão ICV de A-779, não apresentaram diferenças estatísticas em relação a nenhum dos grupos de experimentais ($6,1 \pm 0,72 \times 10^6$ pixels; Figura 36).

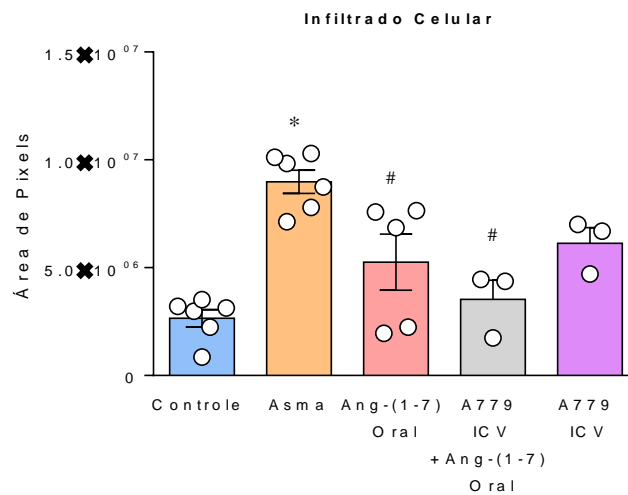


Figura 36. Quantificação do infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos, animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (Oral; $60\mu\text{g}/\text{kg}$), Ang-(1-7) por via oral (Oral; $60\mu\text{g}/\text{kg}$) + A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$) e A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$); $n=3-6$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

No teste comportamental de distância percorrida, como esperado os animais asmáticos apresentaram menor atividade ($568 \pm 54,52\text{ cm}$ $n=20$; Figura 37A) em relação aos animais do grupo controle ($860 \pm 69,64\text{ cm}$ $n=20$), mobilidade que foi recuperada pelo tratamento via oral com Ang-(1-7) ($1008 \pm 97,52\text{ cm}$ $n=9$). No entanto, os animais tratados por via oral com Ang-(1-7) e que receberam o antagonista, A-779, por via ICV não apresentaram diferença na mobilidade

(1016 ± 66,57 cm n=12) em relação aos animais tratados apenas via oral com Ang-(1-7). Os animais asmáticos, que receberam apenas a infusão ICV com A-779 apresentaram maior mobilidade (950 ± 75,82 cm n=11; Figura 37A) em relação aos animais asmáticos sem nenhum tratamento. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais com relação ao comportamento “stand up” (Figura 37B).

Com relação ao comportamento do tipo depressivo, avaliado pelo teste de suspensão pela cauda, houve aumento do tempo de imobilidade dos animais asmáticos (73,05 ± 6,98 seg, n=20 vs 37,82 ± 5,74 seg do controle, n=20; Figura 37C), que foi atenuada pelo tratamento oral com Ang-(1-7) (38,22 ± 4,51 seg, n=9). Os animais asmáticos que receberam o tratamento oral com Ang-(1-7) e A-779 ICV (56,08 ± 7,29 seg, n=12; Figura 37C) e o grupo que recebeu apenas A-779 ICV (63 ± 10,08 seg, n=8) não apresentaram diferenças significativas em relação a nenhum dos grupos experimentais avaliados neste teste.

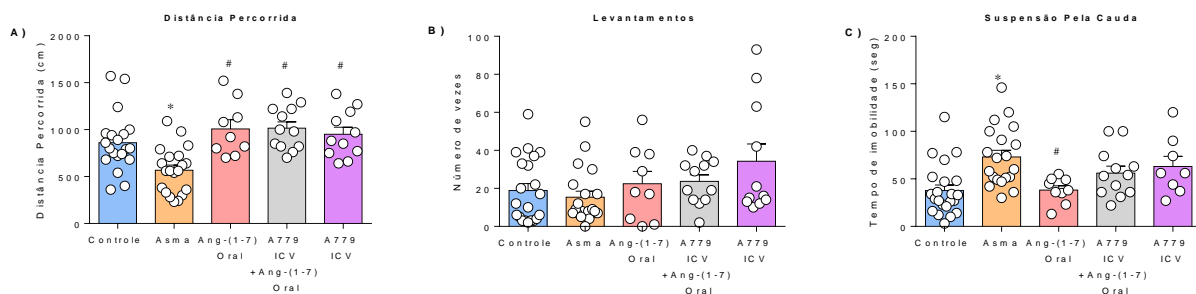


Figura 37. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda. Distância percorrida (A, cm) e número de levantamentos nas patas traseiras (B) no teste em campo aberto e tempo de imobilidade (C, seg) no teste de suspensão pela cauda de animais controle, asmáticos, asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral (60µg/kg) Ang-(1-7) por via oral (Oral; 60µg/ kg) + A-779 ICV (200 ng/h) e A-779 ICV (200 ng/h). n=8-22 por grupo. Os resultados estão expressos como média ± EPM. *p< 0,05 vs controle e # p<0,05 vs asmático (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

5.4.2. Tratamento com Ang-(1-7) via intranasal e A-779 ICV.

Da mesma forma que observado para o tratamento por via oral, a infusão ICV de A-779 não alterou significativamente o efeito da Ang-(1-7) administrada via intranasal quanto ao número total de células observado no LBA, ($0,933 \times 10^5 \pm 0,24$ células, $n=6$ vs. $1,360 \times 10^5 \pm 0,28$ células, $n=10$; Ang-(1-7) intranasal; Figura 38A) e em quantidade de eosinófilos ($0,562 \times 10^5 \pm 0,28$ células, $n=4$ vs. $0,618 \times 10^5 \pm 0,23$ células, $n=9$; Ang-(1-7) intranasal; Figura 38C).

Além disso, os animais asmáticos que receberam apenas o antagonista do receptor Mas, A-779, apresentaram resultados semelhantes ao grupo asmático, quanto ao número total de células ($2,92 \times 10^5 \pm 0,57$ células, $n=8$ vs. $3,35 \times 10^5 \pm 0,51$ células, $n=9$; asmático; Figura 38A) e eosinófilos ($1,47 \times 10^5 \pm 0,54$ células, $n=8$ vs. $2,93 \times 10^5 \pm 0,41$ células, $n=9$; asmático; Figura 38C). Ainda neste grupo, houve um aumento de células mononucleares ($1,52 \times 10^5 \pm 0,37$ células, $n=7$) em comparação aos grupos tratados apenas por via intranasal ($0,60 \times 10^5 \pm 0,09$ células, $n=9$) e o grupo tratado por via oral com Ang-(1-7) e A-779 ICV ($0,43 \times 10^5 \pm 0,12$ células, $n=7$; Figura 38B).

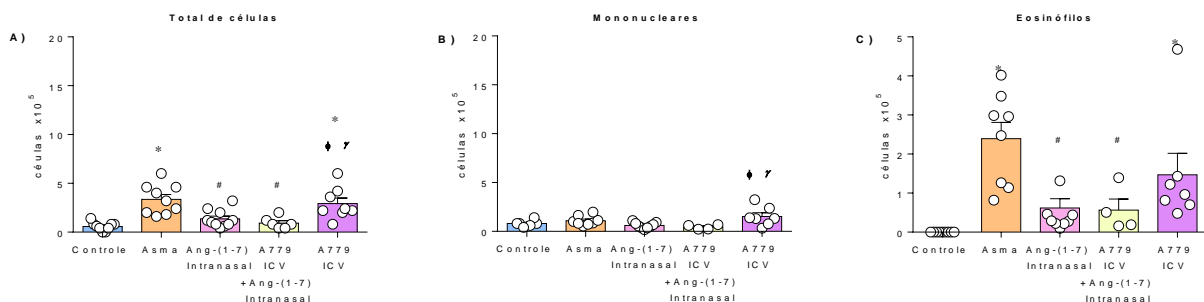


Figura 38. Contagem diferencial de células do fluido do lavado bronco-alveolar (LBA). Total de células, células mononucleares e eosinófilos em animais controle, asmáticos, animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via intranasal (Intranansal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$), Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$) + A-779 ICV (200 ng/h) e A-779 ICV (200 ng/h); $n=6-10$ por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM; * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs asmático, $\phi p < 0,05$ Ang-(1-7) intranasal e $\gamma p < 0,05$ Ang-(1-7) intranasal + A-779 (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Quanto a medida indireta de células inflamatórias no pulmão, a concentração de EPO foi mais elevada no grupo asmático ($0,14 \pm 0,02$ DO/mg de proteína, $n=11$) em relação ao grupo controle ($0,06 \pm 0,01$ DO/mg de proteína, $n=22$), assim como os animais asmáticos que receberam apenas A-779 ICV ($0,14 \pm 0,03$ DO/mg de proteína, $n=11$; Figura 39A).

A concentração da enzima MPO também foi maior no grupo asmático ($0,22 \pm 0,05$ DO/mg de proteína, $n=11$) em relação ao grupo controle ($0,04 \pm 0,00$ DO/mg de proteína; $n=12$; Figura 39B). Com relação a concentração de NAG, o tratamento com Ang-(1-7) intranasal ($0,06 \pm 0,01$ DO/mg de proteína, $n=10$) atenuou a quantidade de macrófagos em relação aos animais asmáticos (asmático ($0,27 \pm 0,08$ DO/mg de proteína, $n=11$), e curiosamente, essa atenuação também foi observada no grupo A-779 ICV ($0,02 \pm 0,00$ DO/mg de proteína, $n=11$; Figura 39C).

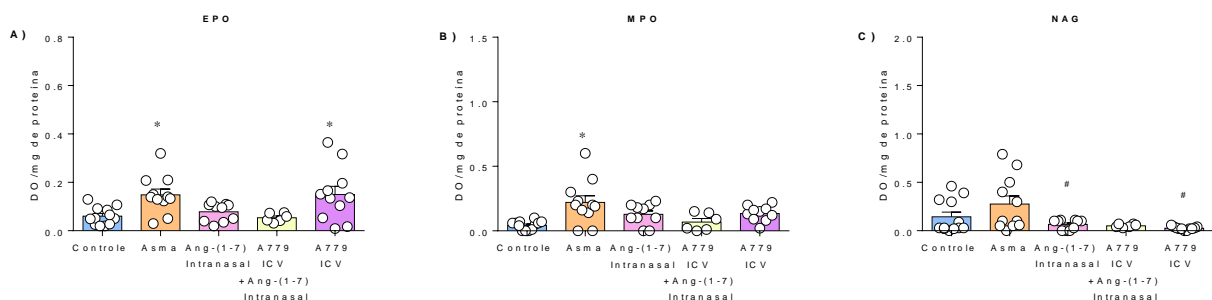


Figura 39. Concentração das enzimas (peroxidase eosinofílica) EPO (A), (mieloperoxidase) MPO (B) e (N-acetilglucosaminidase) NAG (C) no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$), Ang-(1-7) por via Intranasal (Intranasal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$) + A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$) e A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$); $n=6-12$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmático (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

A Figura 40 apresenta os cortes histológicos de pulmão de animais controle, asmático, e tratados com Ang-(1-7) por via intranasal, Ang-(1-7) via intranasal e A-779 ICV e asmáticos que receberam somente A-779 via ICV.

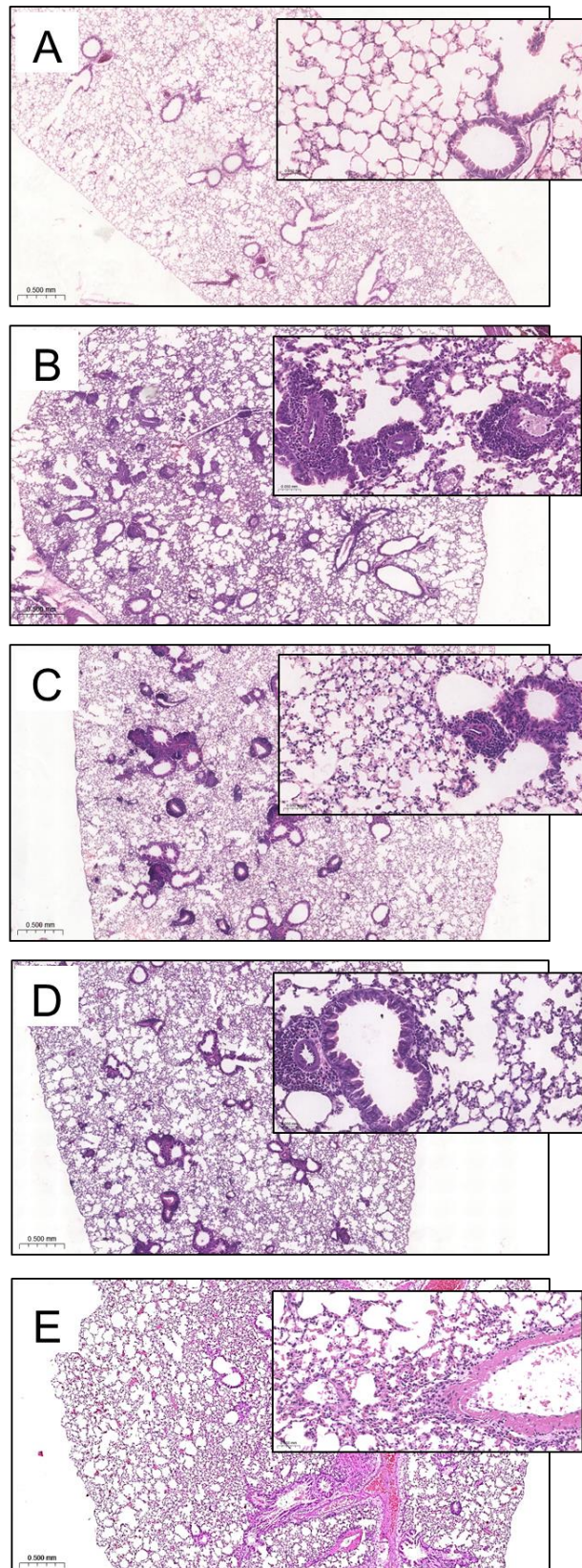


Figura 40. Cortes histológicos do pulmão de animais submetidos ao protocolo experimental de asma. As imagens foram coradas em HE, ilustrando o infiltrado inflamatório no pulmão de animais submetidos ao modelo de asma (2.3x aumento menor e 20x aumento maior). Estão representados animais dos grupos controle (A), asmático (B), asmático tratado com Ang-(1-7) por via intranasal (C); asmático tratado com Ang-(1-7) via intranasal e A-779 ICV (D), e asmático tratado com A-779 ICV (E).

No pulmão, a quantidade de células inflamatórias foi maior em animais asmáticos ($7,9 \pm 0,47 \times 10^6$ pixels, $n=3$) em relação aos animais do grupo controle ($2,3 \pm 0,7 \times 10^6$ pixels, $n=3$). O tratamento via intranasal com Ang-(1-7) atenuou a área infiltrada no pulmão ($3,7 \pm 0,9$ pixels, $n=3$). No entanto, o bloqueio com A-779 ICV em animais tratados via intranasal com Ang-(1-7) não alterou a melhora apresentada pelo tratamento via intranasal ($5,2 \pm 0,1 \times 10^6$ pixels, $n=3$). Já os animais asmáticos que receberam somente A-779 ICV, apresentaram área infiltrada ($6,1 \pm 0,7 \times 10^6$ pixels) semelhante a dos animais asmáticos não tratados ($7,9 \pm 0,47 \times 10^6$ pixels, $n=3$; Figura 41).

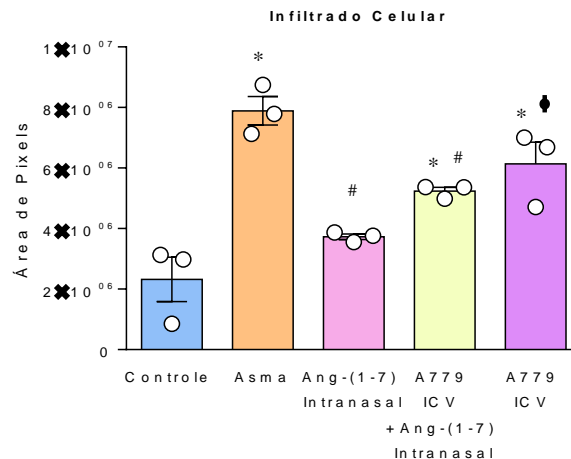


Figura 41. Infiltrado de células inflamatórias no pulmão após indução de modelo experimental de asma alérgica. Animais controle, asmáticos, animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$), Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$) + A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$) e A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$); $n=3$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs asmático e $\phi p < 0,05$ Ang-(1-7) intranasal (One-Way ANOVA seguido do teste de Brown-Forsythe).

Nos testes comportamentais, observamos que o tratamento com Ang-(1-7) intranasal preveniu a redução de motilidade ($1163 \pm 67,58$ cm, $n=10$) no campo aberto observada nos animais asmáticos ($646,7 \pm 74,6$ cm, $n=12$ vs $982,5 \pm 997,36$ cm, $n=12$, controle; Figura 42A). Os animais que receberam Ang-(1-7) e A-779 ICV ($1047 \pm 177,1$ cm, $n=6$) e apenas A-779 ICV ($950 \pm 75,82$

cm, n=11; Figura 42A) não apresentaram diferenças significativas em comparação aos outros grupos experimentais analisados.

O número de levantamentos também não foi diferente entre os grupos avaliados (Figura 42B). No teste de suspensão pela cauda, os animais asmáticos ($64,58 \pm 7,41$ seg, n=12) apresentaram mais tempo de desistência em relação aos animais controle ($29,17 \pm 5,41$ seg, n=12), e o tratamento com Ang-(1-7) intranasal preveniu o aumento do tempo de imobilidade ($23,9 \pm 4,71$ seg, n=10) em relação ao tempo observado nos animais asmáticos. Nos animais tratados por via intranasal com Ang-(1-7) e que também receberam A-779 ICV, o tempo de imobilidade aumentou em relação ao grupo que recebeu apenas o tratamento, embora essa diferença não tenha sido significativa ($43,33 \pm 10,55$ seg, n=8). Os animais asmáticos que receberam apenas A-779 ICV ($63,00 \pm 10,80$ seg, n=8; Figura 42C), apresentaram aumento no tempo de imobilidade em comparação aos grupos controle e Ang-(1-7) intranasal.

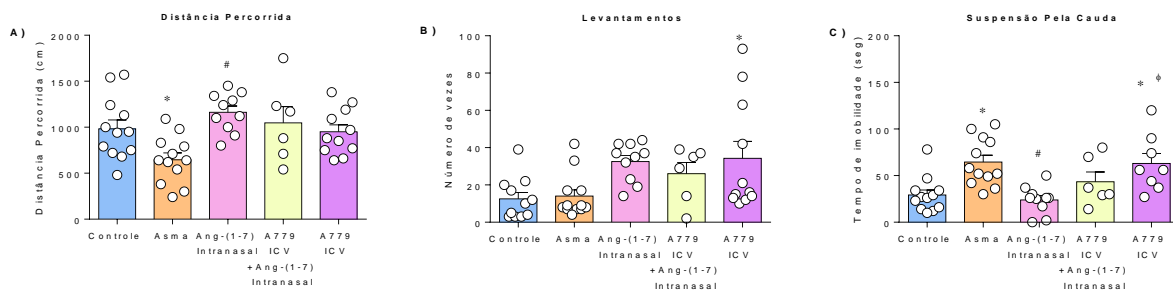


Figura 42. Testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda. Distância percorrida (A, cm) e número de levantamentos nas patas traseiras (B) no teste em campo aberto e tempo de imobilidade (C, seg) no teste de suspensão pela cauda de animais controle, asmáticos e asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via intranasal ($30\mu\text{g}/\text{kg}$), Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$) + A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$) e A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$). n=6-12 por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs asmático e $\phi p < 0,05$ Ang-(1-7) intranasal (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

Da mesma forma que nos protocolos anteriores, o peso dos animais dos grupos controle, asmático e asmático tratados não foi diferente no primeiro ou último dia do protocolo experimental (Figura 43).

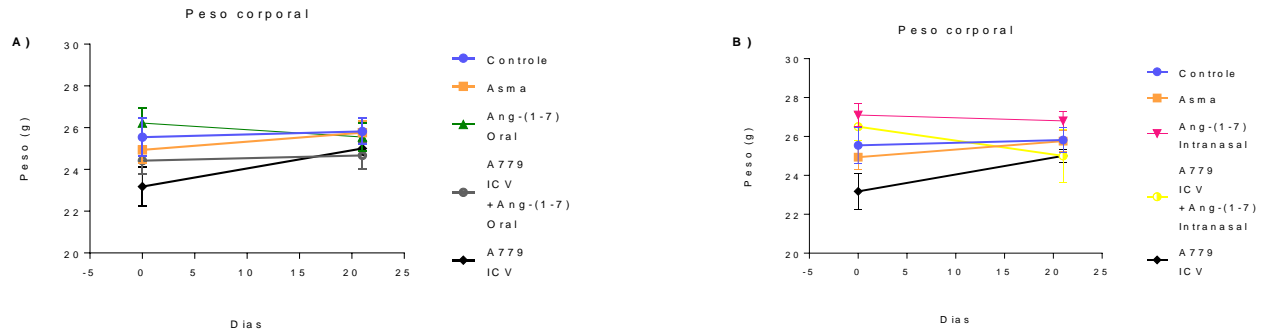


Figura 43. Peso dos animais submetidos ao modelo experimental de asma alérgica. Peso dos animais controle, asmáticos e asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral ($60\mu\text{g}/\text{kg}$), Ang-(1-7) por via oral (Oral; $60\mu\text{g}/\text{kg}$) + A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$) e A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$), representados no gráfico A. E peso dos animais controle, asmáticos e asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via intranasal (Intranasal; $30\mu\text{g}/\text{kg}$) + A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$) e A-779 ICV ($200\text{ ng}/\text{h}$) representados no gráfico B. $n=6-10$ por grupo.

A Tabela 1 sintetiza os principais achados dos protocolos experimentais descritos. As setas indicam diferenças estatísticas em relação ao grupo de animais controle, ou seja, animais não asmáticos.

Tabela 1. Parâmetros inflamatórios e de comportamento de animais asmáticos tratados ou não tratados.

Parâmetros		Animais asmáticos								
		Não Tratado	Ang-(1-7)			A-779 ICV + Ang-(1-7)		A-779 ICV	WT	Mas KO
			Oral	Intra-nasal	ICV	Oral	Intra-nasal			
Inflamação	LBA - Células Totais	↑	-	-	-	-	-	↑	↑	-
	LBA - Eosinófilos	↑↑	↑	-	-	-	-	↑↑	↑	↑
	Pulmão - Infiltrado	↑↑	↑	-	↑	↑	↑	↑↑	↑	↑
	Pulmão - EPO	↑↑	↑	-	-	↑↑	-	↑	↑	-
	Pulmão - MPO	↑	-	-	-	-	-	↓	↑	-
	Pulmão - NAG	-	↓	↓	-	↓↓	↓	↓↓	↑	-
Comportamento	Distancia Percorrida	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓
	<i>Stand up</i>	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
	Tempo de imobilidade	↑↑	-	-	-	↑	-	↑	↑↑	↑↑

LBA= Lavado broncoalveolar; EPO= Peroxidase Eosinofílica; MPO= Mieloperoxidase, NAG= N-acetilglucosaminidase; ICV= Intracerebroventricular. As setas indicam diferença estatística em relação ao grupo controle e o traço indica não significativo. Ang-(1-7) via oral (60µg/ kg), Ang-(1-7) via intranasal (30µg/ kg), A-779 ICV (200 ng/h) animais sem deleção do receptor Mas (WT) e animais transgênicos com deleção do receptor Mas (Mas KO).

5.5. Dosagem de neurotransmissores em áreas do SNC relacionadas ao comportamento emocional de animais submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.

5.5.1. Dosagem de neurotransmissores no córtex pré-frontal

Analisamos a quantidade de noradrenalina (NE), adrenalina (AD), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) no córtex pré-frontal dos grupos experimentais. Os animais asmáticos apresentaram redução significativa nos níveis de NE ($0,25 \pm 0,06$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=5 vs $4,85 \pm 1,14$ ng.mg⁻¹ de proteína animais controle, n=9; Figura 44A), AD ($0,39 \pm 0,08$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=9 vs $14,37 \pm 3,63$ ng.mg⁻¹ de proteína nos animais controle, n=10; Figura 44B), DA ($1,66 \pm 0,09$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=11 vs $16,02 \pm 2,71$ ng.mg⁻¹ de proteína nos animais controle, n=9; Figura 44C) e 5-HT ($0,45 \pm 0,04$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=9 vs $3,87 \pm 0,72$ ng.mg⁻¹ de proteína nos animais controle, n=12; Figura 44D). O tratamento com Ang-(1-7) por via oral ou intranasal não alterou significativamente os níveis reduzidos destes neurotransmissores nos animais asmáticos. O tratamento com Ang-(1-7) por via oral também não mostrou diferença com relação aos valores de NE e 5-HT dos animais controle.

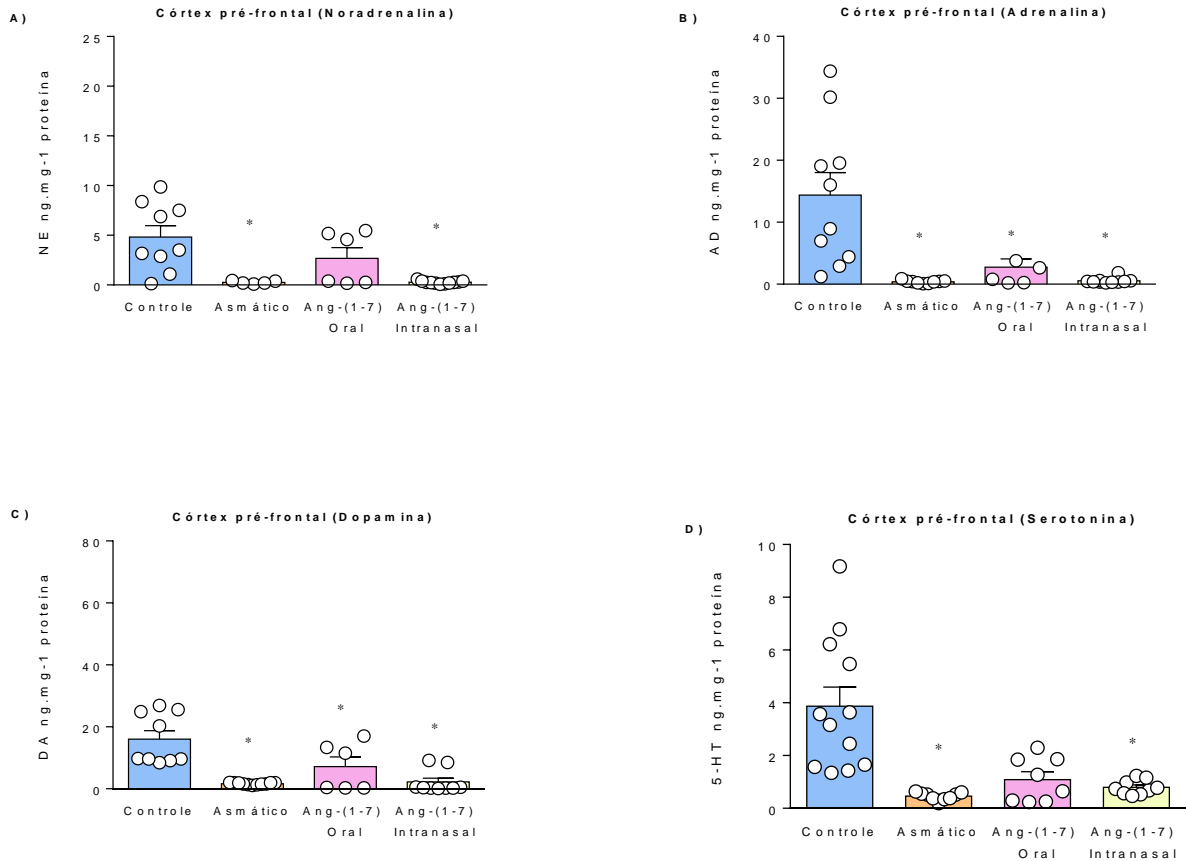


Figura 44. Dosagem de neurotransmissores no córtex pré-frontal de animais submetidos a modelo experimental de asma alérgica. Grupos controle, asmático e tratados com Ang-(1-7) por via oral (60 μ g/kg) e intranasal (30 μ g/kg), n=5-12 por grupo. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

5.5.2. Dosagem de neurotransmissores no hipocampo

No hipocampo, observamos nos animais asmáticos redução significativa dos neurotransmissores NE ($3,15 \pm 0,48$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=11 vs $6,18 \pm 1,35$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=10, nos animais controle; Figura 45A), AD ($4,58 \pm 1,09$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=11 vs $16,02 \pm 3,19$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=10, nos animais controle; Figura 46B) e DA ($2,61 \pm 0,09$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=11 vs $25,34 \pm 6,68$ ng.mg⁻¹ de proteína, n=9, nos animais controle; Figura 45C). Da mesma forma que no córtex, o tratamento com Ang-(1-7) oral ou intranasal não preveniu a redução de neurotransmissores no hipocampo (Figura 45 A-C). Embora os valores de 5-HT nos animais

asmáticos se apresentassem menores do que os dos animais controle, não foi estatisticamente diferente, da mesma forma, os valores obtidos nos animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) (Figura 45D).

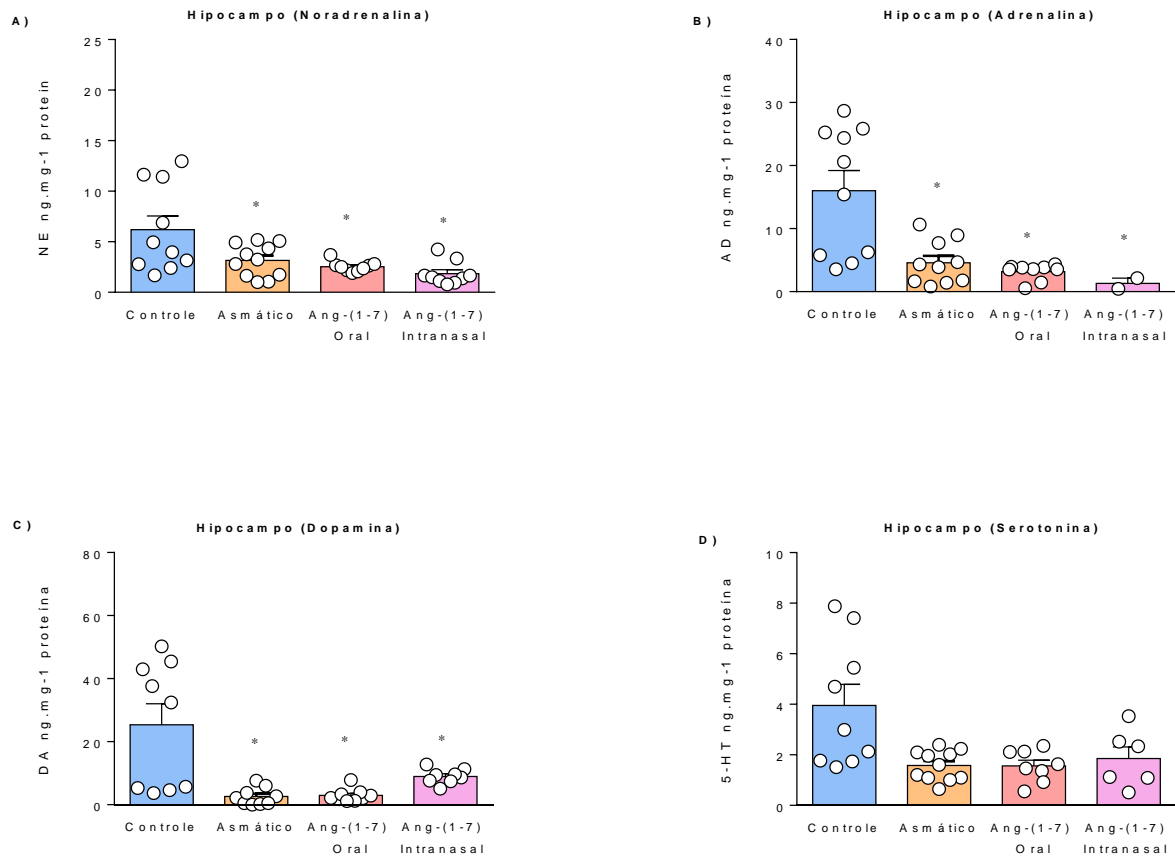


Figura 45. Dosagem de neurotransmissores no hipocampo de animais submetidos a modelo experimental de asma alérgica. Grupos controle, asmático e tratados com Ang-(1-7) por via oral (60µg/kg) e intranasal (30µg/kg), n=3-11 por grupo. Os resultados estão expressos como média ± EPM. *p< 0,05 vs controle (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

5.5.3. Dosagem de neurotransmissores no estriado

Os valores de NE, AD, DA e 5-HT no estriado dos animais asmáticos não foram diferentes dos valores observados em animais controle. O tratamento com Ang-(1-7) não alterou o nível destes neurotransmissores no estriado dos animais asmáticos (Figura 46A – 46D).

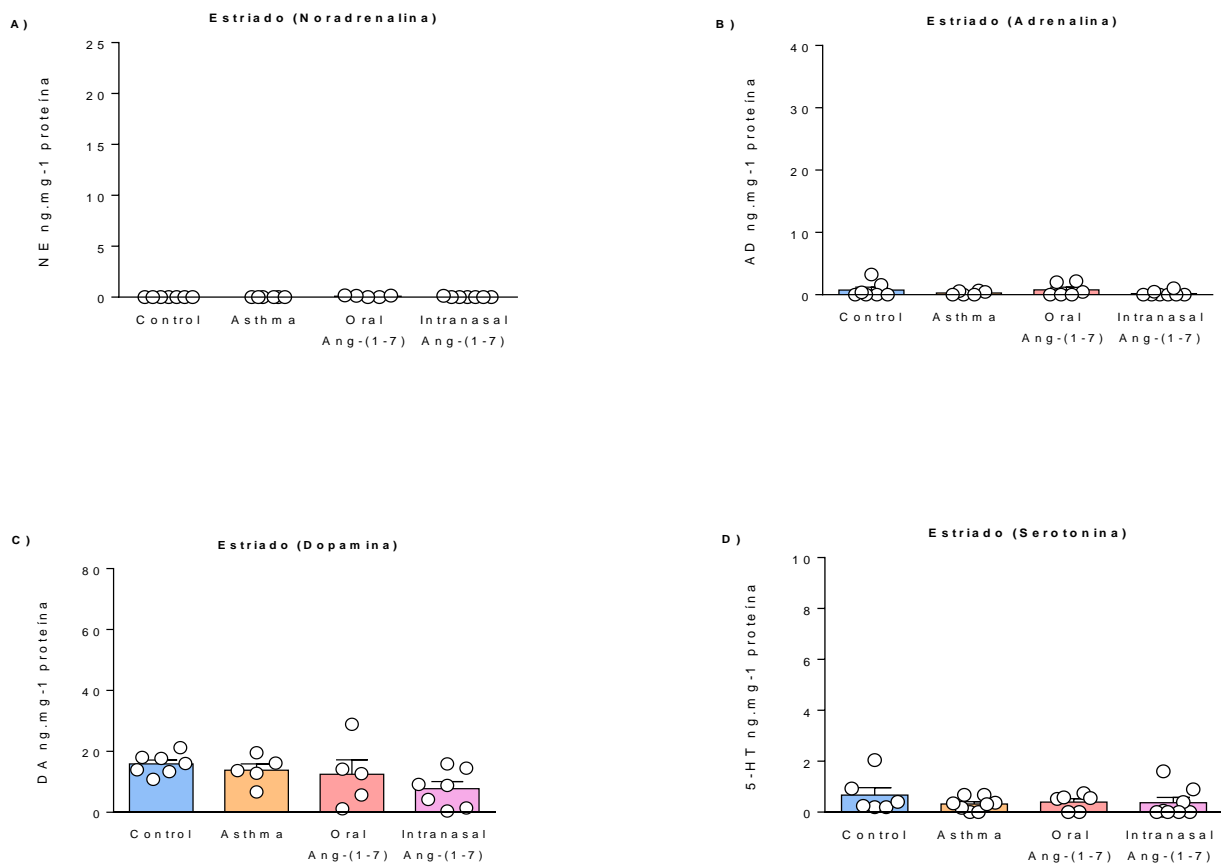


Figura 46. Dosagem de neurotransmissores no estriado de animais submetidos a modelo experimental de asma alérgica. Grupos controle, asmático e tratados com Ang-(1-7) por via oral (60 μ g/kg) e intranasal (30 μ g/kg), n=6-12 por grupo.

5.5.4. Dosagem de neurotransmissores na região da amígdala

Por fim, avaliamos a quantidade de neurotransmissores presentes na região da amígdala. Os animais asmáticos apresentaram níveis mais elevados de noradrenalina, adrenalina, dopamina e serotonina em comparação ao grupo controle. No entanto, essa alteração não foi estatisticamente significativa (Figura 47A - 47D). Os grupos de animais asmáticos tratados por via oral ou intranasal apresentaram níveis destes neurotransmissores semelhantes a dos animais controle (Figura 47A - 47D).

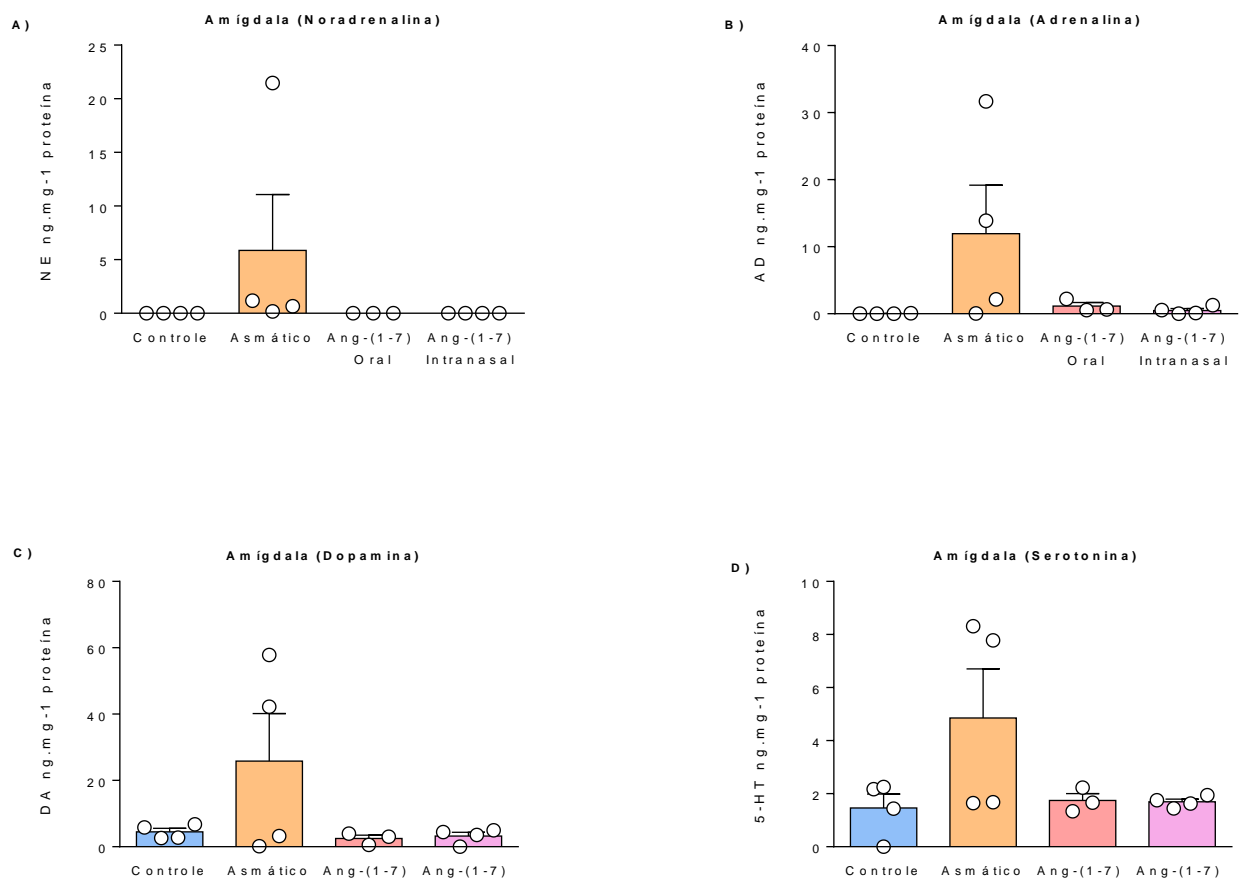


Figura 47. Dosagem de neurotransmissores na região da amígdala de animais submetidos a modelo experimental de asma alérgica. Grupos controle, asmático e tratados com Ang-(1-7) por via oral (60 μ g/ kg) e intranasal (30 μ g/ kg), n=3-4 por grupo.

5.6. Efeito do tratamento periférico com Ang-(1-7) sobre expressão de c-Fos em áreas cerebrais de animais submetidos modelo de asma

A Figura 48 representa um corte frontal do cérebro de camundongo do atlas de Paxinos e Watson (2002) ilustrando a região do hipocampo (seta azul) e a região do PVN (seta vermelha) utilizadas para quantificação de neurônios Fos positivos.

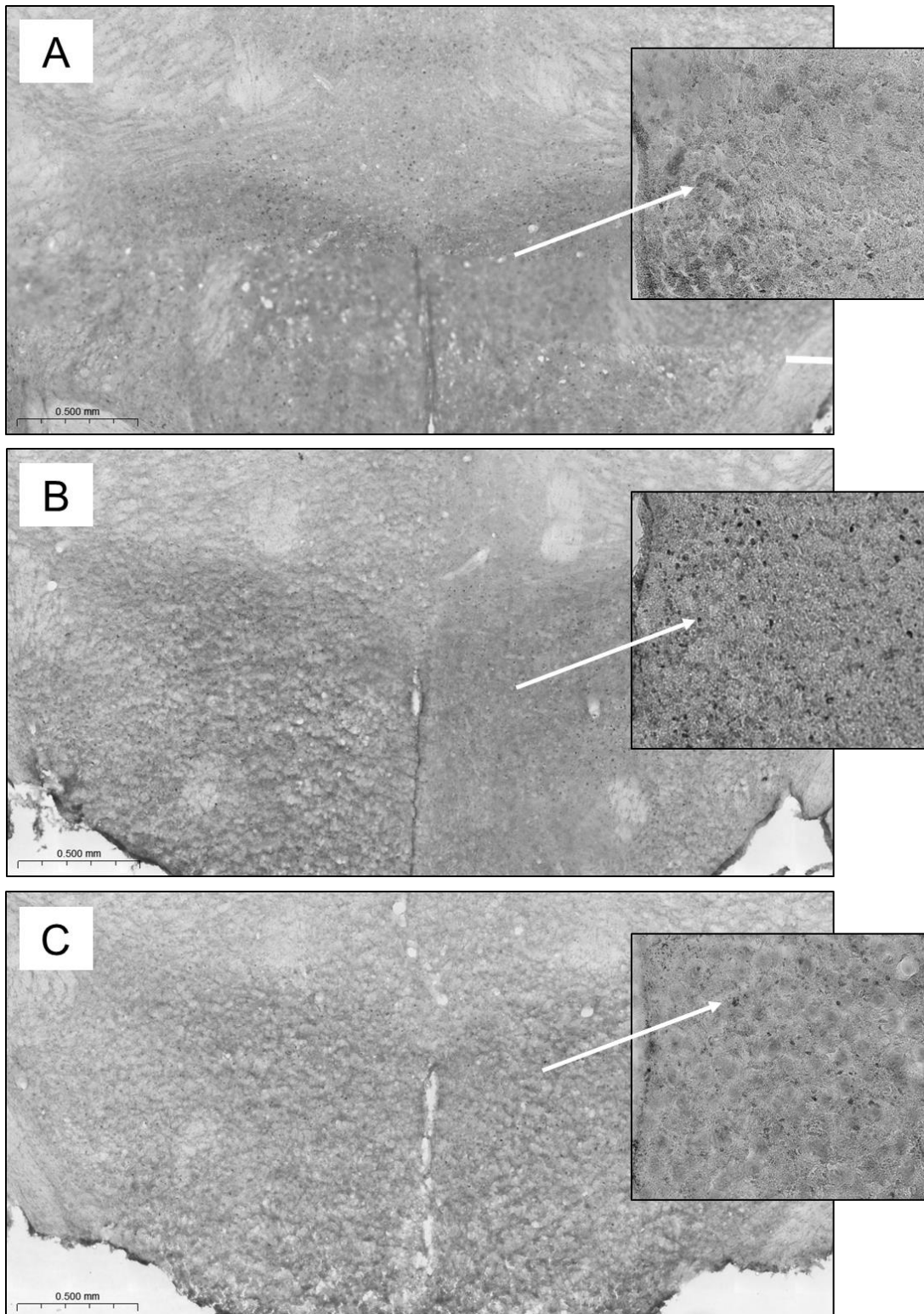


Figura 49. Imagens representativas do PVN (4.0x aumento menor e 20x aumento maior) dos grupos controle (A), asmático (B) e asmático tratado com Ang-(1-7) via oral (C).

Os dados obtidos com a quantificação de c-Fos mostraram que animais asmáticos apresentaram aumento significativo da expressão no PVN ($1879 \pm 399,7$ células Fos positivas, $n=7$) em relação aos animais controle ($470,8 \pm 399,7$ células, $n=6$). Alteração da expressão de c-Fos foi prevenida pela administração oral de Ang-(1-7) ($703,4 \pm 125,5$ células Fos positivas, $n=5$; Figura 50).

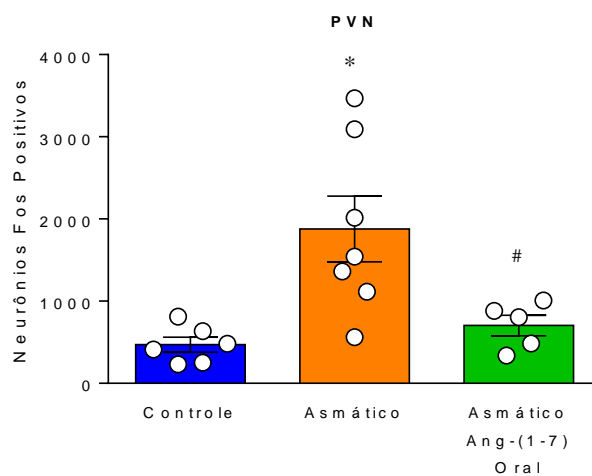


Figura 50. Marcação de c-Fos no PVN. Quantificação da marcação em fatias histológicas (35 μ m) de animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (60 μ g/kg); $n=5-8$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmáticos (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

A Figura 51, apresenta os cortes frontais da região do hipocampo dos grupos experimentais analisados.

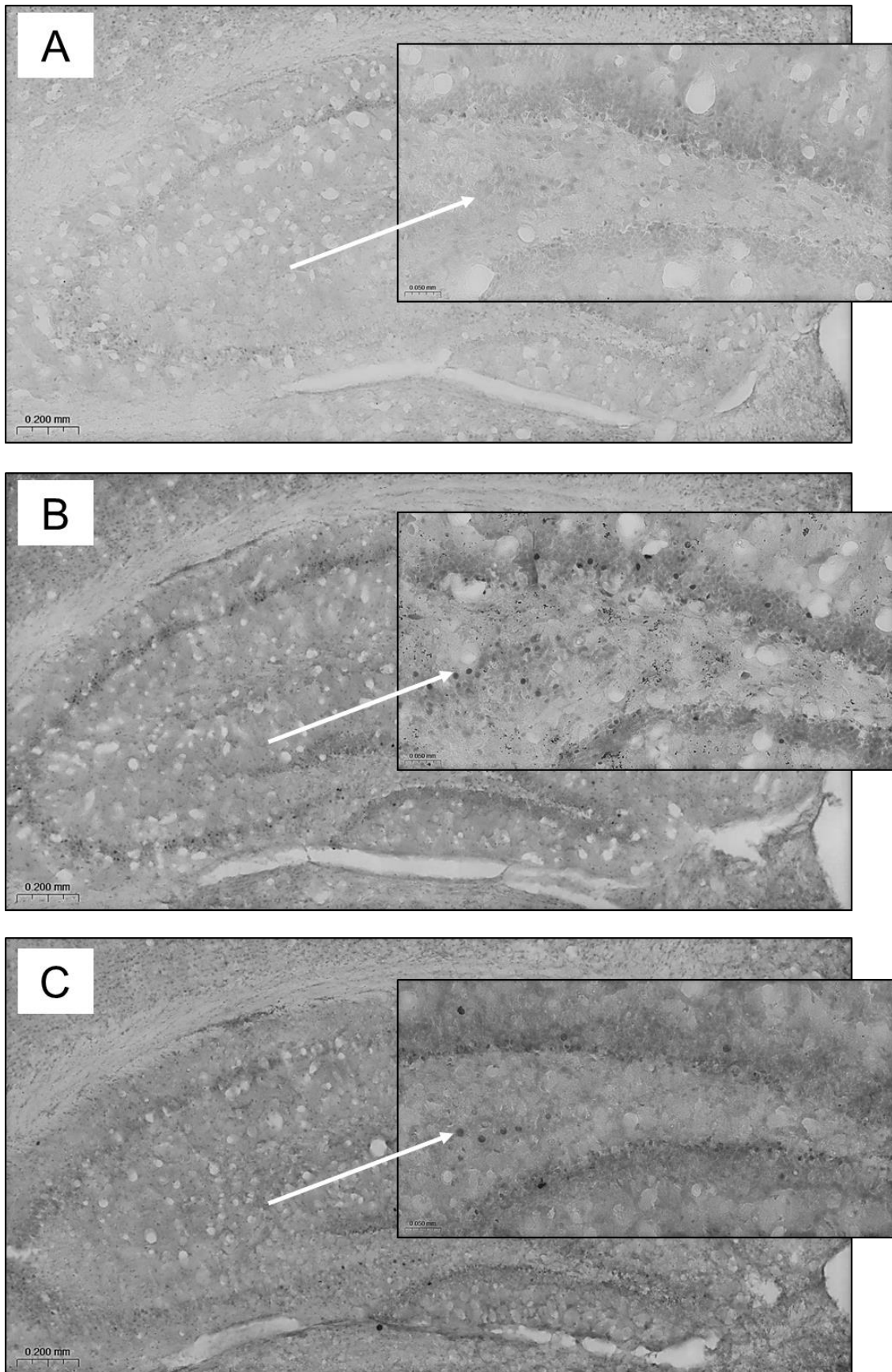


Figura 51. Imagens representativas do hipocampo (4.0x aumento menor e 20x aumento maior) de animais dos grupos controle (A), asmático (B) e asmático tratado com Ang-(1-7) via oral (C).

Os dados obtidos com a quantificação de c-Fos mostraram que animais asmáticos apresentaram aumento significativo da expressão no hipocampo ($2697 \pm 324,3$ células Fos positivas, $n=7$) em relação aos animais controle ($512 \pm 165,9$ células Fos positivas, $n=6$). O aumento da expressão de c-Fos foi prevenido pela administração oral de Ang-(1-7) ($679,9 \pm 173,8$ células Fos positivas, $n=5$; Figura 52).

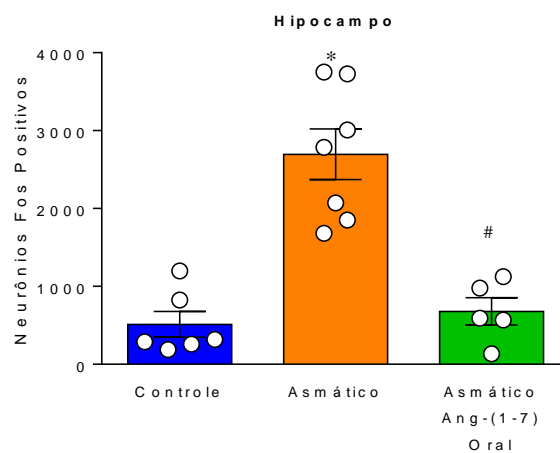


Figura 52. Marcação de c-Fos no hipocampo. Quantificação da marcação em fatias histológicas (35 μ m) de animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral (60 μ g/ kg); $n=5-8$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs asmáticos (One-Way ANOVA seguido pelo teste de Brown-Forsythe).

A Tabela 2 apresenta um resumo dos principais resultados encontrados nesta etapa deste trabalho nos diferentes grupos experimentais avaliados.

Tabela 2. Níveis de neurotransmissores e atividade de c-Fos em diferentes áreas do cérebro de camundongos submetidos ao modelo de asma tratados com Ang-(1-7).

Parâmetros		Animais asmáticos		
		Não Tratado	Ang-(1-7)	
			Oral	Intra-nasal
Neurotransmissores	Córtex Pré-Frontal			
	NE	↓↓	-	↓↓
	AD	↓↓	↓↓	↓↓
	DA	↓↓	↓	↓↓
	5-HT	↓↓	↓↓	↓↓
	Hipocampo			
	NE	↓	↓	↓
	EP	↓↓	↓↓	↓↓
	DA	↓↓	↓↓	↓↓
	5-HT	-	-	-
	Região da Amígdala			
	NE	-	-	-
	EP	-	-	-
	DA	-	-	-
	5-HT	-	-	-
	Estriado			
	NE	-	-	-
	EP	-	-	-
	DA	-	-	-
	5-HT	-	-	-
C-fos	Hipocampo	↑↑	-	
	PVN	↑	-	

NE= noradrenalina, AD= adrenalina; DA= dopamina; 5-HT= serotonina; PVN= Núcleo paraventricular do hipotálamo. As setas indicam diferença estatística em relação ao grupo controle (redução de neurotransmissores) e o traço indica (-) e que não houve alteração dos neurotransmissores avaliados. Ang-(1-7) via oral (60µg/ kg), Ang-(1-7) via intranasal (30µg/ kg) e A-779 ICV (200 ng/h).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que o tratamento de camundongos asmáticos com Ang-(1-7), por via intranasal ou por via oral, além de atenuar parâmetros indicativos de inflamação pulmonar atenua o comportamento do tipo ansioso. Mostramos ainda, que o tratamento ICV de animais asmáticos, com Ang-(1-7), atenua comportamento ansioso e ainda interfere parcialmente com inflamação pulmonar. Além disso mostramos que o protocolo de asma alérgica provocou aumento de neurônios c-Fos positivos no PVN e hipocampo, que foi prevenido após a administração oral de Ang-(1-7). Esses dados sugerem que aumento dos níveis de Ang-(1-7) centrais ou periféricos podem auxiliar no tratamento da asma, atenuando tanto a inflamação pulmonar quanto o comportamento ansioso e que PVN e hipocampo são áreas candidatas para mediar a ação ansiolítica da Ang-(1-7).

O efeito anti-inflamatório pulmonar observado pela administração periférica de Ang-(1-7) está de acordo com estudos anteriores de nosso (MAGALHÃES, G S *et al.*, 2015; 2020; RODRIGUES-MACHADO *et al.*, 2013) e outros laboratórios (EL-HASHIM *et al.*, 2012, 2019). Rodrigues-Machado *et al.* (2013) observaram que o tratamento de animais asmáticos com AVE0991, um agonista não peptídico do receptor Mas, reduziu os níveis de Ang II nos pulmões, preveniu a remodelação pulmonar, inflamação e hipertrofia ventricular direita. Neste estudo, o efeito anti-inflamatório foi observado por meio da redução dos níveis de IL-5, uma citocina pró-inflamatória, e aumento dos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Em estudos subsequentes, Magalhães *et al.* (2015) mostraram que o tratamento com Ang-(1-7) atenua significativamente a inflamação e o remodelamento pulmonar, além de melhorar a reatividade brônquica em um modelo experimental de asma crônica (MAGALHÃES *et al.*, 2015; 2016; 2020; 2021). Além disso, mostramos que a Ang-(1-7) promove a resolução da inflamação pulmonar alérgica, induzindo a apoptose de eosinófilos, a principal célula inflamatória envolvida na patogênese da asma alérgica, e a sua remoção do pulmão (MAGALHÃES *et al.*, 2018), mecanismos que aceleram o retorno a homeostase tecidual.

Nosso estudo também está de acordo com os de COSTA-PINTO *et al.* (2005) e Basso *et al.* (2003), que mostraram que este modelo de indução de asma alérgica induz comportamento do tipo ansioso. Em experimentos preliminares durante a padronização do modelo, não observamos diferença de comportamento do animal asmático no teste de esquiva passiva, como descrito por Costa-Pinto *et al.* (2005). No entanto, no teste em campo aberto, que é amplamente utilizado para avaliar comportamento do tipo ansioso, os animais asmáticos percorreram distâncias menores ou seja, apresentaram-se mais inativos. Devido a crescente associação entre depressão e ansiedade como comorbidades, torna se difícil a separação da relação causa-efeito entre as duas, especialmente quando há o envolvimento de um terceiro componente como neuroinflamação (CARISSIMI *et al.*, 2018). Por esse motivo, outro parâmetro, avaliado juntamente com a ansiedade, foi a depressão. Em nosso estudo, os animais asmáticos também apresentaram maior comportamento do tipo depressivo, que pôde ser observado por meio do aumento de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. No entanto, uma questão importante está relacionada a capacidade locomotora frente a doença pulmonar que poderia afetar o desempenho do animal e invalidar a realização destes testes. Embora não tenhamos testado a força muscular dos animais para descartar esta possibilidade, três resultados sugerem que esta é improvável: 1) o peso dos animais asmáticos não foi alterado ao longo do protocolo; 2) Um porcentagem expressiva (60%) de animais asmáticos apresentaram resposta idêntica a dos animais controle no teste de esquiva passiva realizado em experimentos piloto de padronização (Figura 1A em anexo), da mesma forma que animais com altos níveis de EPO percorreram distâncias no teste de campo aberto semelhante a de animais com baixos níveis de EPO (Figura 2A em anexo) e, 3) animais asmáticos que receberam infusão ICV de Ang-(1-7) não apresentaram comportamento ansioso/ depressivo apesar de apresentar aumento da quantidade de eosinófilos.

O presente estudo avança no conhecimento ao mostrar que comportamentos do tipo ansioso ou depressivo dos animais asmáticos foram atenuados pelo tratamento oral ou intranasal com Ang-(1-7), o que pode representar um benefício adicional para o tratamento da asma, uma vez que a

ansiedade e depressão representam comorbidades importantes com doenças inflamatórias sistêmicas e que tornam, doenças como a asma, mais graves e de mais difícil controle (DI MARCO *et al.*, 2010; VIEIRA, A. A. *et al.*, 2011; MOZZINI MONTEIRO *et al.*, 2016). Além disso, estudos recentes mostram que pacientes que tiveram asma na infância ou adolescência tem maior risco de apresentar distúrbios de comportamento de enfrentamento ao estresse na vida adulta e velhice (CAULFIELD; SCHOPF; CAVIGELLI, 2021). Estes resultados também foram observados em camundongos 9 semanas após a interrupção do estímulo alergênico (CAULFIELD, 2021).

No presente trabalho, administramos Ang-(1-7) por meio de duas vias periféricas diferentes, a via oral e a via intranasal. Utilizando um raciocínio translacional, a administração de medicamentos por via oral é a mais utilizada, por ser uma via segura, indolor e que permite autoadministração. As drogas administradas por via oral ficam limitadas a exercer um efeito sistêmico, isso porque a BHE é um empecilho para a entrada, principalmente de peptídeos, no SNC. A administração por via intranasal, por outro lado foi escolhida para comparação porque proporciona uma forma não invasiva de contornar a BHE (MEREDITH; SALAMEH; BANKS, 2015). Estudos mostram que a droga que é administrada via intranasal pode atingir o SNC por vias neurais por meio dos nervos olfatório e trigêmeo, que inervam a cavidade nasal, proporcionando uma conexão direta com o SNC (THORNE *et al.*, 2008). Esses estudos apontam que as vantagens de usar a administração intranasal incluem minimizar a exposição a órgãos e tecidos periféricos, reduzindo assim os efeitos colaterais sistêmicos e, permitir também que substâncias que normalmente têm rápida degradação no sangue exerçam seu efeito. Além disso, os estudos ainda mostram que a entrega intranasal fornece a capacidade de direcionar proteínas e peptídeos para regiões específicas do cérebro quando administrados com substratos como as ciclodextrinas (LOCHHEAD; THORNE, 2012; MEREDITH; SALAMEH; BANKS, 2015; NONAKA *et al.*, 2012; BANKS; DURING; NIEHOFF, 2004).

A fisiopatologia dos distúrbios de comportamento relacionados a inflamação pulmonar ainda foi pouco estudada. Os mediadores inflamatórios no pulmão se ligam a receptores seletivos

das terminações sensoriais aferentes causando ativação de áreas cerebrais, ativação de micróglia, liberação de neurotransmissores, entre outras (DEHDAR *et al.*, 2019). O acesso central dos mediadores inflamatórios liberados no pulmão poderia ainda se dar através das áreas desprovidas da BHE ou via terminações nervosas aferentes do nervo vago que se projetam para o NTS, primeiro sítio de integração no SNC, como descrito na introdução. Desta forma, a Ang-(1-7) administrada por via oral ou intranasal, ao atenuar a inflamação pulmonar na asma alérgica, reduziria os níveis de citocinas pulmão, na circulação e possivelmente também no SNC, resultando na redução da atividade de áreas cerebrais envolvidas com a resposta ao estresse emocional (depressão e ansiedade), bem como as áreas envolvidas com a ativação do eixo HPA. O resultado obtido com c-Fos no PVN e hipocampo está de acordo com esta possibilidade. Desta forma, o efeito ansiolítico e antidepressivo obtido com a administração periférica de Ang-(1-7) poderia estar relacionado exclusivamente ao efeito anti-inflamatório pulmonar. No entanto, observamos que nos animais asmáticos que receberam infusão de Ang-(1-7) ICV, o comportamento do tipo ansioso/ depressivo foi prevenido mesmo na presença de inflamação pulmonar.

O efeito benéfico da Ang-(1-7), administrada no SNC, sobre o comportamento emocional já foi explorado em nosso e outros laboratórios (DE MELO 2020; WANG *et al.* 2016; BILD *et al.*, 2013), em outros modelos experimentais. Kangussu *et al.* (2013) mostraram que ratos com redução de angiotensinogênio no cérebro apresentavam comportamentos similares à ansiedade e depressão, e que a infusão ICV de Ang-(1-7) reverteu tais alterações comportamentais. E ao contrário, uma linhagem de rato transgênico que tem níveis circulantes aumentados de Ang-(1-7) apresentou redução do comportamento ansioso, que foi abolida após a infusão ICV com A-779. Com relação as respostas cardiovasculares ao estresse, em nosso laboratório Martins Lima *et al.*, (2013) demonstraram que a injeção ICV ou endovenosa de Ang-(1-7) reduziu a taquicardia evocada pelo estresse induzido por jato de ar, e que este efeito era revertido na presença de A-779, sugerindo o envolvimento do eixo Ang-(1-7)/Mas na resposta cardiovascular ao estresse emocional agudo. Neste mesmo sentido, outro estudo observou que microinjeções de Ang-(1-7)

na amígdala basolateral bloquearam completamente a taquicardia e atenuaram a resposta pressora induzida pelo estresse do jato de ar (OSCAR *et al.*, 2015).

Considerando o efeito ansiolítico e antidepressivo da Ang-(1-7) administrada por via ICV descritos acima, não podemos descartar um efeito direto da Ang-(1-7) administrada por via oral nas áreas desprovidas da BHE ou ainda um acesso ao SNC através dos nervos olfatório e trigêmeo, da Ang-(1-7) administrada por via intranasal. Tanto as áreas desprovidas de barreira (órgãos circumventriculares- OVLT, órgão subfornical, AP, recesso preoptico, hipófise, etc) como as áreas/núcleos que recebem informação dos nervos olfatórios (córtex) e trigêmeo (NTS) estão envolvidas ou se projetam para as principais áreas relacionadas com comportamento/estresse emocional (amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal entre outras) (DAVIDSON, 2003; ROXO *et al.*, 2011). Outra possibilidade é o acesso da Ang-(1-7) às áreas dentro da BHE devido à ruptura da integridade da barreira em decorrência da inflamação pulmonar, uma vez que os mediadores inflamatórios e os leucócitos estão na circulação sanguínea. Assim, não podemos afirmar que o efeito ansiolítico da Ang-(1-7) se restringiu a periferia, ou seja, à sua ação anti-inflamatória no pulmão. Na tentativa de avaliar se parte do efeito observado com a administração periférica da Ang-(1-7) poderia estar relacionada a ação no SNC, infundimos via ICV o antagonista do receptor Mas, o A-779, em animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) por via oral ou intranasal. A-779 não impediu a melhora dos parâmetros inflamatórios e comportamentais obtidos com o tratamento periférico com Ang-(1-7). Esse dado sugere que a redução do comportamento ansioso é obtida pela redução da inflamação periférica. No entanto, é necessário elencar algumas possibilidades antes de se estabelecer esta conclusão.

Inicialmente, uma possibilidade que não pode ser descartada neste estudo é a interação da Ang-(1-7) com outros receptores insensíveis ao A-779, como o receptor AT₂. O receptor AT₂ é amplamente distribuído no SNC (GUIMOND; GALLO-PAYET, 2012). Estudos anteriores demonstraram que Ang-(1-7) se liga com baixa afinidade aos receptores AT₁ e AT₂ (ROWE *et al.*, 1995). O bloqueio do receptor AT₂, com PD123319 no PVN diminuiu a atividade simpática

do nervo renal, mas não teve efeito significativo na PA e na frequência cardíaca (SILVA; SANTOS; FONTES, 2005). Ademais, Qadri *et al.* (1998) mostraram que o efeito da microinjeção de Ang-(1-7) no PVN, induziu a liberação de vasopressina, no entanto, esse efeito foi prevenido pela administração de losartan (antagonista de AT₁) e PD123319 (antagonista de AT₂ e MrgD) indicando que algumas ações da Ang-(1-7) podem ser mediadas por outros receptores além do Mas (QADRI *et al.*, 1998). Além disso, há a possibilidade de o efeito estar sendo mediado por outros fragmentos da Ang-(1-7), alamandina ou Ang-(3-7). A alamandina (Ala¹-Arg²-Val³-Tir⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷) é o mais recente peptídeo do SRA, que se difere da Ang-(1-7) apenas pela presença da alanina no lugar do aspartato. A alamandina apresenta efeitos biológicos semelhantes aos da Ang-(1-7), que não são antagonizados por A-779, visto que as ações da alamandina são mediadas pelo receptor MrgD (LAUTNER *et al.*, 2013). Da mesma forma, a Ang-(3-7), fragmento do SRA que poderia ser formado a partir da Ang-(1-7), mostrou efeitos sobre a PA e na FC de ratos, que também não foram alterados na presença de A779 ou losartan (FERREIRA *et al.*, 2007).

Outra possibilidade, menos plausível, poderia estar relacionada a discrepância entre as áreas atingidas pela infusão ICV de A-779 e aquelas onde a Ang-(1-7) administrada periféricamente estaria atuando. É esperado que as áreas primárias a serem atingidas por infusão ICV de peptídeos sejam as áreas circunventriculares e, possivelmente, áreas/ núcleos adjacentes a estas, especialmente considerando a infusão contínua de longo prazo (Paxinos e Watson, 2002). Entre essas podemos destacar o PVN, a AP, o NTS. No entanto, estudo de Glascock *et al.* (2011) mostraram que uma infusão ICV pode ser capaz de atingir os hemisférios esquerdo e direito e o bulbo olfatório em aproximadamente 60 minutos (GLASCOCK *et al.*, 2011). O receptor Mas está amplamente distribuído nestas áreas (BECKER *et al.*, 2007; BUNNEMANN *et al.*, 1990; METZGER *et al.*, 1995). Além disso, há uma boa sobreposição entre as áreas circunventriculares e as desprovidas da BHE ou que recebem aferências diretas dos nervos vago, trigêmeo e olfatório e que poderiam ser afetadas diretamente pela Ang-(1-7) (THORNE *et al.*, 2008). No entanto, ainda precisaremos responder a questão: quais são as áreas críticas para a atuação no modelo de

inflamação pulmonar alérgica? Em nosso estudo mostramos que pelo menos o PVN e o hipocampo seriam áreas envolvidas no efeito da Ang-(1-7). No entanto, se outras áreas também participam da resposta e se a alteração da atividade destas áreas é decorrente de atuação direta ou indireta da Ang-(1-7), ainda deverá ser esclarecido em estudos futuros. Da mesma forma, ainda deverá ser esclarecido se a infusão ICV do antagonista se difunde para estas áreas ou para áreas que se projetam para estas.

Finalmente, outra possibilidade também pouco plausível para explicar a falha do A779 em bloquear o efeito ansiolítico da Ang-(1-7), é se a taxa de infusão do antagonista foi suficiente para produzir bloqueio efetivo do receptor Mas. No entanto, estudos anteriores mostraram que a infusão ICV de Ang-(1-7) [200 ng/h] em ratos hipertensos aumentou o tônus parassimpático, e esse efeito foi abolido por uma co-administração de A-779 (1 µg/h) (KANGUSSU *et al.*, 2015). Em um outro estudo, a administração de Ang-(1-7) [5 nmol/ µl] atenuou significativamente as deficiências cognitivas em ratos com diabetes, e este efeito foi revertido na presença de A-779 [50 nmol/µl], (CHEN *et al.*, 2017).

Outro resultado de nosso estudo é que a infusão ICV de A-779 em animais asmáticos não tratados, modificou pouco a resposta inflamatória e o comportamento do tipo ansioso, sugerindo que animais asmáticos apresentam baixos níveis de Ang-(1-7) cerebral, ou ainda, que o efeito da Ang-(1-7) está relacionado a outro receptor, o AT₂ como discutido acima. Da mesma forma que mencionado acima, há a possibilidade da taxa de infusão ter sido insuficiente para promover o bloqueio efetivo do receptor Mas ou não ter atuado nas regiões críticas para as respostas avaliadas neste estudo. Um resultado que corrobora a ausência de efeito com a infusão ICV de A-779, foi obtido em animais MasKO. Em nosso estudo, animais com deleção do receptor Mas asmáticos apresentaram quadro inflamatório pulmonar e comportamentos do tipo ansioso e depressivo similar a dos animais selvagens asmáticos. A resposta inflamatória do MasKO à OVA contrastou com estudo anterior do nosso laboratório (MAGALHÃES *et al.*, 2016), que mostrou que a deleção genética do receptor Mas, agrava a inflamação pulmonar induzida por OVA. No entanto, no

estudo de MAGALHÃES *et al.*, (2016), os animais foram submetidos a modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica onde os animais receberam 4 imunizações com OVA e foram submetidos a 4 semanas de desafios com OVA.

Um outro aspecto de nosso estudo é que a infusão ICV com Ang-(1-7) produziu pequena redução na inflamação pulmonar nos animais asmáticos, sugerindo que a Ang-(1-7) pode modular a inflamação pulmonar via SNC, adicionando mais uma evidência de que a conexão neuro-imune não é unidirecional, e pode depender de eferência colinérgica vagal como descrito na introdução (COSTA-PINTO *et al.*, 2005 e 2007; BASSO *et al.*, 2003). Esta via pode ter sido ativada nos animais asmáticos que receberam infusão Ang-(1-7) ICV, o que poderia explicar o efeito anti-inflamatório do tratamento ICV com Ang-(1-7), ainda que pequeno. Este resultado está de acordo com os estudos de Passaglia *et al.*, (2020) que observaram que a administração de Ang-(1-7) ICV atenuou a inflamação periférica em animais submetidos ao modelo de inflamação induzido por LPS (PASSAGLIA *et al.*, 2020). Além disso, estudos anteriores de nosso laboratório em animais hipertensos (KANGUSSU *et al.*, 2015) ou submetidos a modelo de síndrome metabólica (GUIMARAES *et al.*, 2014) mostraram que a infusão ICV de Ang-(1-7) aumenta o tônus parassimpático cardíaco. Interessante observar que alguns autores mostraram que os níveis plasmáticos de TNF em animais submetidos ao modelo de inflamação sistêmica por LPS, não foram alterados pela vagotomia cervical bilateral. De fato, os níveis de TNF aumentaram após a secção do nervo esplênico maior, sugerindo que o braço eferente do reflexo seria na verdade o nervo simpático esplênico e não o nervo vago, como postulado anteriormente (HUSTON *et al.*, 2006; ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009). Além disso, Passaglia *et al.*, (2020) mostraram que o efeito anti-inflamatório da Ang-(1-7) administrada ICV em modelo de endotoxemia por LPS depende de eferência simpática. Estudos futuros deverão avaliar se a Ang-(1-7) ICV altera o tônus autonômico (parassimpático ou simpático) para o pulmão.

No presente estudo avaliamos a expressão de c-Fos em neurônios do PVN e hipocampo, regiões do SNC que estão envolvidas em padrões comportamentais relacionados ao controle

afetivo e emocional. Costa-Pinto *et al.* (2007) mostraram que camundongos com alergia alimentar, exibiram também comportamento mais ansioso, aumento de corticosterona sérica e maior marcação c-Fos em núcleos relacionados ao controle emocional, como a região da amígdala e o PVN. Em nosso trabalho, os animais asmáticos também apresentaram maior expressão de neurônios Fos positivos na região do PVN e do hipocampo. Além disso, o tratamento com Ang-(1-7) por via oral foi capaz de atenuar a expressão nestas áreas. Considerando que o PVN está envolvido na resposta ao estresse e que recebe projeções de áreas sensoriais envolvidas com a aferência inflamatória, como o NTS (HOSOI *et al.*, 2005), é esperado o aumento de c-Fos no PVN. Além disso, um estudo recente mostrou que infusão de IL-1 β no PVN, aumentou a expressão de proteína ácida fibrilar glial, e induziu comportamentos semelhantes a ansiedade (SHIM *et al.*, 2019). O hipocampo, por outro lado, é uma região que recebe projeções da amígdala e juntamente com o córtex pré-frontal regulam respostas emocionais como o medo e a ansiedade (BANNERMAN *et al.*, 2003, 2004; FANSELOW; DONG, 2010). Além disso, Bannerman *et al.* (2003) observaram que lesões no hipocampo de ratos apresentaram um efeito ansiolítico, diminuindo o comportamento de congelamento em resposta estímulo de medo condicionado (choque), sem afetar a resposta motora que foi observada por meio do teste em campo aberto. Nossos resultados estão de acordo com estes dados, e sugerem que a maior ativação neuronal no hipocampo observada em nosso estudo, pode estar diretamente relacionada ao aumento dos níveis de ansiedade induzidos pela asma alérgica. É interessante mencionar que no estudo de COSTA-PINTO *et al.* (2006) foi observado que a expressão de c-Fos no PVN e amígdala foram dependentes dos níveis de IgE. De acordo, em estudo anterior mostramos que o tratamento com Ang-(1-7) atenua os níveis de IgE circulantes em modelo de asma alérgica (MAGALHÃES *et al.*, 2015; MAGALHÃES *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, o tratamento com Ang-(1-7) atenuou a inflamação pulmonar e os comportamentos de ansiedade/ depressão em animais com asma alérgica. A redução da atividade de áreas envolvidas com estresse emocional pelo tratamento com Ang-(1-7) foi evidenciada pela

redução da expressão de c-Fos no PVN e Hipocampo. A expressão de c-Fos em outras áreas deverá ser avaliada em estudos futuros. No entanto, os tratamentos com Ang-(1-7) não provocaram alteração nos níveis reduzidos dos neurotransmissores avaliados, noradrenalina, adrenalina, dopamina e serotonina no córtex pré-frontal e noradrenalina, adrenalina e dopamina no hipocampo dos animais asmáticos. Assim, outros mediadores ou outros mecanismos devem estar envolvidos no efeito ansiolítico da Ang-(1-7) nos animais asmáticos, pelo menos nestas áreas.

A serotonina é um neurotransmissor bastante estudado tanto na doença da asma quanto da ansiedade. Kanaya *et al.* (2012) observaram em um modelo experimental de asma alérgica (com antígeno de ácaro da poeira doméstica), que os animais apresentavam comportamento do tipo depressivo e elevação de citocinas pró-inflamatórias séricas. Estes resultados foram associados a maior ativação neuronal, aumento de proteína ácida fibrilar glial e quimase no cérebro dos animais asmáticos (KANAYA *et al.*, 2022). Em nosso estudo, observamos que o protocolo de asma reduziu a quantidade de serotonina apenas na região do córtex pré-frontal, e que esta não foi alterada pelos tratamentos com Ang-(1-7). Interessante mencionar, que ratos transgênicos que apresentam superexpressão de uma proteína produtora de Ang-(1-7) tecidual, especialmente no cérebro, (ratos TG-L7371-ANDI) exibem comportamento menos ansioso, mas não apresentam diferença nos níveis cerebrais de serotonina (dosada no cérebro inteiro; Alenina N, dados não publicados, comunicação pessoal). Estes dados reforçam a necessidade de se realizar uma exploração mais sistemática das áreas e neurotransmissores que poderiam estar relacionados com os efeitos benéficos da Ang-(1-7).

A disfunção da neurotransmissão monoaminérgica (dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina) pelo estresse emocional é descrita como a hipótese mais prevalente na fisiopatologia da depressão/ ansiedade (DELGADO, 2000; LIU *et al.*, 2017). A terapia antidepressiva de primeira linha baseada na hipótese da monoamina tem prevalecido por quase 70 anos, e visa melhorar o nível de monoaminas (como a serotonina e norepinefrina) no cérebro (LIU *et al.*, 2017). No entanto, o efeito terapêutico é limitado, pois geralmente leva várias semanas ou meses para

alcançar efeitos benéficos e até 30% dos pacientes não respondem a medicamentos antidepressivos (LIU *et al.*, 2017; JAKOBSEN *et al.*, 2017), sugerindo que a hipótese da monoamina pode não representar completamente o mecanismo fisiopatológico da depressão/ ansiedade.

De forma geral os mecanismos cerebrais envolvidos no comportamento ansioso ou depressivo em animais submetidos a modelos de asma ainda foram muito pouco estudados. Outros neurotransmissores envolvidos nas condições neuropsiquiátricas, incluindo a depressão e ansiedade, envolvem a disfunção do sistema gabaérgico, glutamatérgico e colinérgicos (DUMAN; SANACORA; KRYSTAL, 2019; PHAM *et al.*, 2009). Em nossa pesquisa bibliográfica, não encontramos estudos mostrando alteração destes mediadores em animais asmáticos. Desta forma, os níveis destes neurotransmissores e das monoaminas deverão ser avaliados em outras áreas do SNC para se identificar quais mediadores estariam envolvidos no efeito ansiolítico da Ang-(1-7) em animais asmáticos.

Nos últimos anos, muitos estudos mostraram de forma consistente que a neuroinflamação induzida por doença inflamatória periférica ou por estresse emocional e as mudanças subsequentes nas regiões cerebrais envolvidas na regulação emocional, desempenham papel essencial no desenvolvimento patológico de doenças neuropsiquiátricas, incluindo depressão e transtornos de ansiedade (ARRANZ; GUAYERBAS, FUENTE, 2007; DOWLATI *et al.*, 2010; MAES *et al.*, 1998; MICHPOULOS *et al.*, 2017; PITSAVOS *et al.*, 2006; SALIM; CHUGH; ASGHAR, 2012; ZORRILLA *et al.*, 2001).

Zhang *et al.* (2019) postularam que TNF- α , IL-1 β e IFN- γ poderiam ser os biomarcadores neuropsicológicos envolvidos no fenótipo da asma. Eles observaram que pacientes asmáticos com sintomas de depressão, apresentaram pior controle da asma, dispneia mais grave e elevação da quantidade de neutrófilos em escarro. Além disso, encontraram níveis mais elevados de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ no sangue e IL-1 β e IFN- γ escarro, que foram superiores em relação aos pacientes asmáticos não depressivos (ZHANG *et al.*, 2019). Estudos também mostraram que a administração de IL-1 β no PVN de ratos induziu aumento da liberação de GABA em astrócitos e

comportamento do tipo ansioso (SHIM *et al.*, 2019). De acordo, tratamento que induziu inibição das células gliais, inativou astrócitos, reduziu a liberação de GABA e também reduziu os comportamentos semelhantes à ansiedade (SHIM *et al.*, 2019). Por outro lado, estudos anteriores mostraram que a Ang-(1-7) tem efeito anti-inflamatório, reduzindo IL- β , IL-6 e TNF- α no SNC em hipertensão arterial e acidente vascular encefálico (KANGUSSU *et al.*, 2021, 2022). Desta forma, os níveis de citocinas no plasma e SNC de animais asmáticos tratados com Ang-(1-7) deverá ser avaliado em estudos futuros.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO E ETAPAS FUTURAS

O presente estudo apresenta algumas limitações e/ou etapas que deverão ser abordadas em trabalhos futuros. Por exemplo, há a necessidade de se comprovar que os animais asmáticos não apresentam incapacidade motora decorrente da baixa oxigenação ou força muscular, o que poderia invalidar os testes comportamentais em campo aberto e suspensão pela cauda. As dosagens de IgE circulante, citocinas e Ang-(1-7) no pulmão, circulação e no SNC poderiam contribuir para elucidar os resultados. Além disso, em estudos futuros será importante identificar as áreas cerebrais atingidas pelo tratamento periférico e ICV com Ang-(1-7), bem como a possibilidade de formação de outro peptídeo e ainda, identificar o receptor envolvido no efeito ansiolítico/depressivo em animais asmáticos.

7. SÍNTESE DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

O tratamento de camundongos asmáticos com Ang-(1-7), oral ou intranasal, atenuou o comportamento do tipo ansioso e os parâmetros indicativos de inflamação pulmonar. Além disso, o tratamento por via oral com Ang-(1-7) reduziu a atividade neuronal em áreas relacionadas ao controle do comportamento emocional de enfrentamento ao estresse, no PVN e hipocampo, como evidenciado pela expressão de c-Fos. No entanto, tratamento com Ang-(1-7) não alterou os níveis reduzidos de neurotransmissores no córtex e hipocampo. O efeito ansiolítico e anti-inflamatório da Ang-(1-7) não foi alterado com infusão ICV de A-779 e animais MasKO apresentaram quadro inflamatório pulmonar e comportamentos ansiolítico/ depressivo semelhante a camundongos selvagens. Por outro lado, a infusão ICV de Ang-(1-7) também induziu efeito ansiolítico acompanhado de efeito anti-inflamatório pulmonar parcial. A figura 53 representa o resumo dos principais achados deste trabalho.

Em conjunto os resultados do presente estudo confirmaram que a Ang-(1-7) apresenta efeito anti-inflamatório e ansiolítico em modelo de inflamação alérgica, que confere a este peptídeo um benefício adicional para o tratamento de doenças inflamatórias, como a asma.

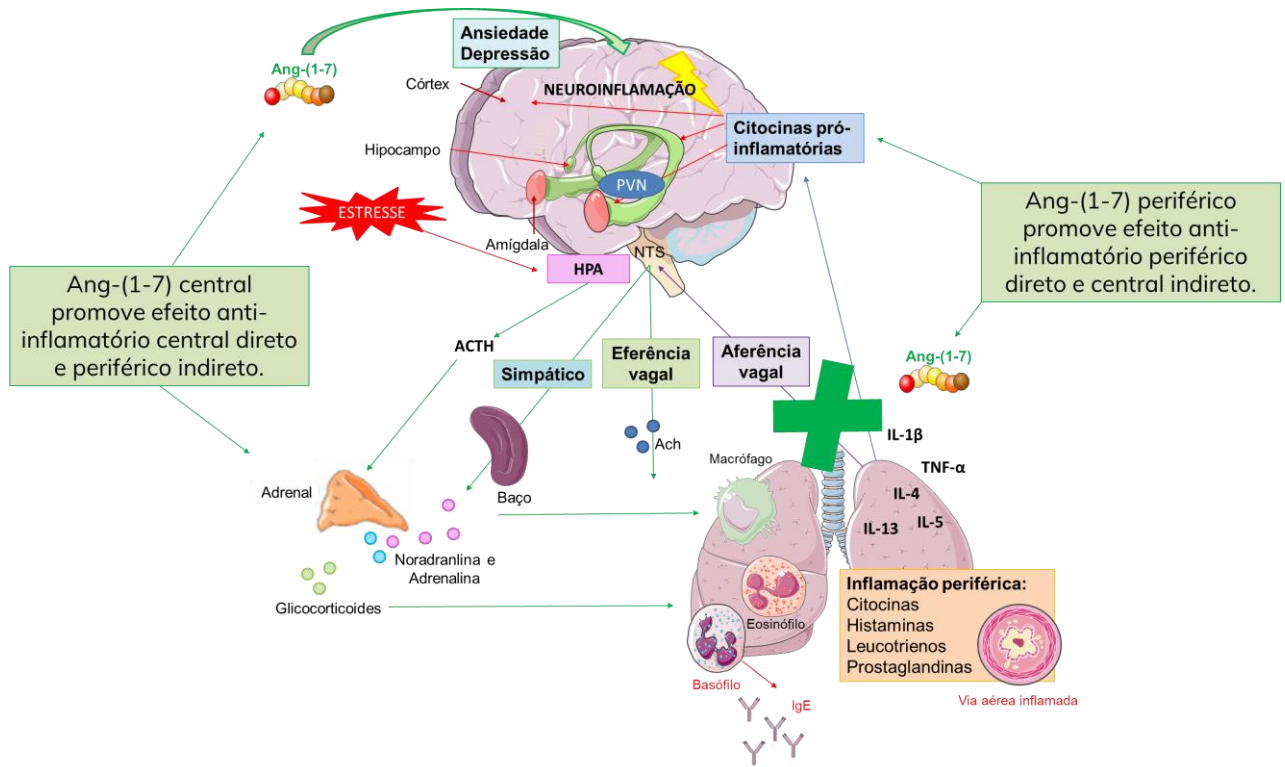


Figura 53. Resumo gráfico dos resultados. A Ang-(1-7) administrada por via oral ou intranasal, ao atenuar a inflamação pulmonar alérgica, reduziria a sinalização inflamatória para o SNC, resultando na redução da atividade de áreas cerebrais envolvidas na resposta emocional. Outra possibilidade é que parte da atuação da Ang-(1-7) tenha efeito direto no SNC (poderia passar também por áreas desprovidas da BHE). Além disso, a Ang-(1-7) administrada no SNC poderia mediar a inflamação periférica via reflexo anti-inflamatório humoral, simpático ou vagal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI A, TOPIWALA MA, GORDON JA. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron*. 2010 Jan 28;65(2):257-69.
- ALMEIDA-FILHO, N.; LESSA, I.; MAGALHAES, L.; ARAUHO, M.J.; AQUINO, E.; DE JESUS, M.J. Co-occurrence patterns of anxiety, depression and alcohol use disorders. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci*. 2007, 257, 423–431
- ALMEIDA-SANTOS, A. F. et al. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of angiotensin-(1-7) in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Clinical Science*, v. 130, n. 14, p. 1247–1255, 13 jun. 2016.
- ANISMAN H, MERALI Z, HAYLEY S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*. 2008 May;85(1):1-74.
- ANISMAN, H.; ZACHARKO, R. M. Depression: The predisposing influence of stress. *Behavioral and Brain Sciences*, v. 5, p. 89–137, 1982.
- ANTONIJEVIC, I. A. Depressive disorders -- is it time to endorse different pathophysiologies? *Psychoneuroendocrinology*, v. 31, n. 1, p. 1–15, jan. 2006.
- ARBORELIUS, L. et al. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *The Journal of Endocrinology*, v. 160, n. 1, p. 1–12, jan. 1999.
- ARRANZ L, GUAYERBAS N, DE LA FUENTE M. Impairment of several immune functions in anxious women. *J Psychosom Res*. 2007 Jan;62(1):1-8
- ASTON-JONES G, CHIANG C, ALEXINSKY T. Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Prog Brain Res*. 1991;88:501-20.
- BANKS WA, DURING MJ, NIEHOFF ML. Brain uptake of the glucagon-like peptide-1 antagonist exendin(9-39) after intranasal administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 May;309(2):469-75.
- BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 28, n. 3, p. 273–283, maio 2004.
- BANNERMAN, D. M. et al. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioural Brain Research*, v. 139, n. 1–2, p. 197–213, 17 fev. 2003.
- BARLOW, D. H. *Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic*. New York, NY, US: Guilford Press, 1988. (Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic).
- BARNES PJ. Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Dec;134(6):1289-314.
- BARNES, Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1, 242–245 (1986).

- BARROSO, L. C. et al. Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Neutrophilic Inflammation in a Model of Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Frontiers in Immunology*, v. 8, 20 nov. 2017.
- BARROSO, L. C. et al. Renoprotective Effects of AVE0991, a Nonpeptide Mas Receptor Agonist, in Experimental Acute Renal Injury. *International Journal of Hypertension*, v. 2012, p. 1–8, 2012.
- BASSO, A. S. et al. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *Journal of Neuroimmunology*, v. 140, n. 1–2, p. 69–77, jul. 2003.
- BASTOS, A. C. et al. Oral formulation angiotensin-(1-7) therapy attenuates pulmonary and systemic damage in mice with emphysema induced by elastase. *Immunobiology*, v. 225, n. 2, p. 151893, mar. 2020.
- BEKASSY Z, LOPATKO FAGERSTRÖM I, BADER M, KARPMAN D. Crosstalk between the renin-angiotensin, complement and kallikrein-kinin systems in inflammation. *Nat Rev Immunol*. Epub 2021 Nov 10. 2022
- BECKER LK, ETELVINO GM, WALTHER T, SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1416–H1424, 2007.
- BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major depressive disorder. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 1, p. 55–68, 3 jan. 2008.
- BELOVA, L. A. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Moscow)*, v. 65, n. 12, p. 1337–1345, 2000.
- BENNION, D. M. et al. Neuroprotective Mechanisms of the ACE2–Angiotensin-(1-7)–Mas Axis in Stroke. *Current Hypertension Reports*, v. 17, n. 2, fev. 2015.
- BERTONCELLO, N. et al. Diabetic Nephropathy Induced by Increased Ace Gene Dosage Is Associated with High Renal Levels of Angiotensin (1–7) and Bradykinin. *Journal of Diabetes Research*, v. 2015, p. 1–13, 2015.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*, v. 17, n. 1, p. 64–102, 1 fev. 1996.
- BILD, W.; CIOBICA, A. Angiotensin-(1–7) central administration induces anxiolytic-like effects in elevated plus maze and decreased oxidative stress in the amygdala. *Journal of Affective Disorders*, v. 145, n. 2, p. 165–171, fev. 2013.
- BOROVIKOVA et al., Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):458-62.
- BOSCARINO JA, CHANG J. Higher abnormal leukocyte and lymphocyte counts 20 years after exposure to severe stress: research and clinical implications. *Psychosom Med*. 1999 May-Jun;61(3):378-86.
- BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 17, n. 3, p. 295–303, set. 2015.
- BRAMBILLA, F. et al. Plasma interleukin-1 beta concentrations in panic disorder. *Psychiatry Research*, v. 54, n. 2, p. 135–142, nov. 1994.

- BREMNER, J. D. Does stress damage the brain? *Biological Psychiatry*, v. 45, n. 7, p. 797–805, 1 abr. 1999.
- BRIDGES, K. W.; GOLDBERG, D. P. Somatic presentation of DSM III psychiatric disorders in primary care. *Journal of psychosomatic research*, v. 29, n. 6, p. 563–569, 1985.
- BUNNEMANN B, et al. Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neurosci Lett*. 1990 Jul 3;114(2):147-53.
- BYSTRITSKY, A. et al. Brain circuitry underlying the ABC model of anxiety. *Journal of Psychiatric Research*, v. 138, p. 3–14, 2021.
- CAMPANHA, S. M. A.; FREIRE, L. M. S.; FONTES, M. J. F. O impacto da asma, da rinite alérgica e da respiração oral na qualidade de vida de crianças e adolescentes. *Revista CEFAC*, v. 10, p. 513–519, dez. 2008.
- CARISSIMI, A. et al. Intermittent hypoxia, brain glyoxalase-1 and glutathione reductase-1, and anxiety-like behavior in mice. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 40, p. 376–381, 9 ago. 2018.
- CATT, K. J. et al. The role of angiotensin II receptors in vascular regulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 6 Suppl 4, p. S575-586, 1984.
- CAULFIELD, J. I. Anxiety, depression, and asthma: New perspectives and approaches for psychoneuroimmunology research. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, v. 18, dez. 2021.
- CAULFIELD, J. I.; SCHOPF, K. J.; CAVIGELLI, S. A. Peri-adolescent asthma: acute impacts on innate immune response, corticosterone, and microglia in mice. *Journal of neuroimmunology*, v. 350, p. 577450, 2021.
- CHAVAN, S. S.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity*, v. 46, n. 6, p. 927–942, 20 2017.
- CHEETHAM, S. C., CROMPTON, M. R., KATONA, C. L. E. & Horton, R. W. (1990) Brain 5-HT₁ binding sites in depressed suicides, *Psychopharmacology*, 102, 544–548.
- CHEN, J.-L. et al. Angiotensin-(1–7) administration attenuates Alzheimer’s disease-like neuropathology in rats with streptozotocin-induced diabetes via Mas receptor activation. *Neuroscience*, v. 346, p. 267–277, 27 mar. 2017.
- CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001.
- COSTA-PINTO, F. A. et al. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 19, n. 1, p. 52–60, jan. 2005.
- COSTA-PINTO, F. A. et al. Neural Correlates of IgE-Mediated Allergy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1088, n. 1, p. 116–131, 1 nov. 2006.
- CRASKE, M. G.; STEIN, M. B. Anxiety. *Lancet (London, England)*, v. 388, n. 10063, p. 3048–3059, 17 2016.

- 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, 1 nov. 2010.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 9, n. 1, p. 46–56, jan. 2008.
- DANTZER, R. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa. *Physiological reviews*, v. 98, n. 1, p. 477–504, 2018.
- DE MELO LA, ALMEIDA-SANTOS AF. Neuropsychiatric Properties of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas Pathway: A Brief Review. *Protein Pept Lett*. 2020;27(6):476-483.
- DEAKIN, J. F., PENNELL, I., UPADHYAYA, A. J. & LOFTHOUSE, R. A. (1990) Neuroendocrine study of 5HT function in depression: evidence for biological mechanisms of endogenous and psychosocial causation, *Psychopharmacology*, 101, 85–92.
- DELGADO, P.L. Depression: The case for a monoamine deficiency. *J. Clin. Psychiatry* 2000, 61 (Suppl. S6), 7–11.
- DENJEAN A, CANET E, PRAUD JP, GAULTIER C, BUREAU M. Hypoxia-induced bronchial responsiveness in awake sheep: role of carotid chemoreceptors. *Respir Physiol*. 1991 Feb;83(2):201-10.
- DI MARCO, F. et al. Close correlation between anxiety, depression, and asthma control. *Respiratory Medicine*, v. 104, n. 1, p. 22–28, jan. 2010.
- DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*, v. 87, n. 5, p. e1–e9, 2000.
- DOWLATI Y, HERRMANN N, SWARDFAGER W, LIU H, SHAM L, REIM EK, LANCTÔT KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010 Mar 1;67(5):446-57.
- DUMAN, R. S.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J. H. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron*, v. 102, n. 1, p. 75–90, Abril 2019.
- DUNN AJ, WANG J. Cytokine effects on CNS biogenic amines. *Neuroimmunomodulation*. 1995 Nov-Dec;2(6):319-28.
- ELENKOV, I. J. et al. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews*, v. 52, n. 4, p. 595–638, dez. 2000.
- EL-HASHIM, A. Z. et al. Ang-(1-7)/ MAS1 receptor axis inhibits allergic airway inflammation via blockade of Src-mediated EGFR transactivation in a murine model of asthma., v. 14, n. 11, p. e0224163, 2019.
- EL-HASHIM, A. Z. et al. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-κB-dependent pathways. *British Journal of Pharmacology*, v. 166, n. 6, p. 1964–1976, jul. 2012.

- ETELVINO GM, PELUSO AA, SANTOS RA. (2014). New components of the renin-angiotensin system: alamandine and the MAS-related G protein-coupled receptor D. *Curr Hypertens Rep.* 16(6): 433-436.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, v. 65, n. 1, p. 7, 14 jan. 2010.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): Cardioprotective Effect in Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Hypertension*, v. 38, n. 3, p. 665–668, 1 set. 2001.
- FERREIRA, P. M.; SOUZA DOS SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Angiotensin-(3–7) pressor effect at the rostral ventrolateral medulla. *Regulatory Peptides*, v. 141, n. 1, p. 168–174, 7 jun. 2007.
- FINKELMAN, F. D. et al. Key advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2009. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, p. 312–318, fev. 2010.
- GALEA, I. The blood-brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cell. Mol. Immunol.* 2021, 18, 2489–2501.
- GEISTERFER AA, PEACH MJ, OWENS GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res.* 62: 749 -756, 1988.
- GEORAS, S. N. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *European Respiratory Journal*, v. 26, n. 6, p. 1119–1137, 1 dez. 2005.
- GEPPETTI, R PATACCHINI, R NASSINI, S MATERAZZI, Cough: The emerging role of the TRPA1 channel. *Lung* 188, S63–S68 (2010).
- GIARDINA, W. J.; EBERT, D. M. Positive effects of captopril in the behavioral despair swim test. *Biological Psychiatry*, v. 25, n. 6, p. 697–702, 1989.
- GINA - GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Pocket Guide for Asthma Management and Prevention. 1-32, 2020.
- GLASCOCK, J. J. et al. Delivery of Therapeutic Agents Through Intracerebroventricular (ICV) and Intravenous (IV) Injection in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, n. 56, 3 out. 2011.
- GOMES DA SILVA, A. Q.; SOUSA DOS SANTOS, R. A.; PELIKY FONTES, M. A. Blockade of Endogenous Angiotensin-(1–7) in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Reduces Renal Sympathetic Tone. *Hypertension*, v. 46, n. 2, p. 341–348, Agosto 2005.
- GRAEFF, F. G. SEROTONERGIC SYSTEMS. *Psychiatric Clinics of North America*, v. 20, n. 4, p. 723–739, Dezembro 1997.
- GRAY JA. The neuropsychology of anxiety: an enquire into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford; Oxford University Press, 1982.
- GREGÓRIO, J. F. et al. Asthma: role of the angiotensin-(1-7)/Mas (MAS1) pathway in pathophysiology and therapy. *British Journal of Pharmacology*, v. 178, n. 22, p. 4428–4439, nov. 2021.

- GUIMARAES, P. S. et al. Increasing Angiotensin-(1–7) Levels in the Brain Attenuates Metabolic Syndrome–Related Risks in Fructose-Fed Rats. *Hypertension*, v. 63, n. 5, p. 1078–1085, 2014.
- GUIMARAES, P. S., SANTIAGO, N. M., XAVIER, C. H., VELLOSO, E. P., FONTES, M. A., SANTOS, R. A., & CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. (2012). Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *American Journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 303, H393–H400
- GUIMOND, M.-O.; GALLO-PAYET, N. The Angiotensin II Type 2 Receptor in Brain Functions: An Update. *International Journal of Hypertension* v. 2012, 2012.
- HALL, J. E. Control of blood pressure by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Clinical cardiology*, v. 14, n. S4, p. 6–21, 1991.
- HAROON, E.; RAISON, C. L.; MILLER, A. H. Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Impact of Inflammation on Behavior. *Neuropsychopharmacology*,
- HELLNER, K. et al. Angiotensin-(1–7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 29, n. 3, p. 427–435, jul. 2005.
- HICKMAN, D. L. et al. Commonly Used Animal Models. *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students*, p. 117–175, 2017.
- HIDEAKI YAMAMOTO; SEDGWICK JB; BUSSE WW. Differential regulation of eosinophil adhesion and transmigration by pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol.* , 1998
- HINDMARCH, I. Expanding the horizons of depression: beyond the monoamine hypothesis. *Human Psychopharmacology*, v. 16, n. 3, p. 203–218, abr. 2001.
- HOGUE, E. A. et al. Broad spectrum of cytokine abnormalities in panic disorder and posttraumatic stress disorder. *Depression and Anxiety*, v. 26, n. 5, p. 447–455, 2009.
- HOLGATE, S. T.; FINNERTY, J. P. Recent advances in understanding the pathogenesis of asthma and its clinical implications. *QJM: An International Journal of Medicine*, v. 66, n. 1, p. 5–19, 1988.
- HOSOI, T. et al. Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: possible role of nodose ganglion. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, v. 120, n. 1–2, p. 104–107, 15 jun. 2005.
- HOU R, BALDWIN DS. A neuroimmunological perspective on anxiety disorders. *Hum Psychopharmacol.* 2012 Jan;27(1):6-14. Epub 2011 Dec 26.
- HOVATTA I, JUHILA J, DONNER J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res.* 2010 Dec;68(4):261-75.
- HUANG Y, WONGAMORNTHAM S, KASTING J, MCQUILLAN D, OWENS RT, YU L, NOBLE NA, BORDER W. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int.* 2006 Jan;69(1):105-13.

- HUSTON, J. M. et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 7, p. 1623–1628, 10 jul. 2006.
- ITO R, LEE ACH. The role of the hippocampus in approach-avoidance conflict decision-making: Evidence from rodent and human studies. *Behav Brain Res*. 2016 Oct 15;313:345-357.
- JAKOBSEN et al. Selective serotonin reuptake inhibitors versus placebo in patients with major depressive disorder. A systematic review with meta-analysis and Trial Sequential Analysis. *BMC Psychiatry* 2017, 17, 58.
- JENDZJOWSKY et al. Preventing acute asthmatic symptoms by targeting a neuronal mechanism involving carotid body lysophosphatidic acid receptors. *Nat Commun*. 2018 Oct 2;9(1):4030.
- JI Y, LIU J, WANG Z, LIU N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem*. 2009;23(4-6):265-76.
- JOHN NOLAND MACKESZIE. THE PRODUCTION OF THE SO-CALLED “ROSE COLD” BY MEANS OF AN ARTIFICIAL ROSE. [S.l.]: Elsevier BV, 1886.
- KANAYA, A. et al. Chronic allergic lung inflammation negatively influences neurobehavioral outcomes in mice. *Journal of Neuroinflammation*, v. 19, n. 1, p. 210, Agosto 2022.
- KANGUSSU LM, GUIMARAES PS, NADU AP, MELO MB, SANTOS RA, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Activation of angiotensin-(1-7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology*. 2015 Oct;97:58-66. Epub 2015 May 15.
- KANGUSSU, L. M. et al. Activation of angiotensin-(1–7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology*, v. 97, p. 58–66, Outubro 2015.
- KANGUSSU, L. M. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Behavioural Brain Research*, v. 257, p. 25–30, nov. 2013.
- KANGUSSU, L. M. et al. Angiotensin-(1-7) Central Mechanisms After ICV Infusion in Hypertensive Transgenic (mRen2)27 Rats. *Frontiers in Neuroscience*, v. 15, 23 abr. 2021.
- KANGUSSU, L. M. et al. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1–7): Role of the Mas receptor. *Behavioural Brain Research*, v. 331, p. 193–198, jul. 2017.
- KANGUSSU, L. M. et al. Transgenic rat with overproduction of ubiquitous angiotensin-(1-7) presents neuroprotection in a model of ischemia and reperfusion. *Brain Research Bulletin*, 23 nov. 2022.
- KAWANO H, MASUKO S. Region-specific projections from the subfornical organ to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *Neuroscience*. 2010 Sep 1;169(3):1227-34.
- KEHOE, K. et al. Dysregulation of the renin-angiotensin system during lung ischemia-reperfusion injury. *Experimental Lung Research*, v. 42, n. 6, p. 277–285, 2 jul. 2016.

- KIM S et al. In vivo activation of rat aortic platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptors by angiotensin II and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 2539–2545, 2000.
- KONSMAN, J.P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* 2002, 25, 154–159.
- LANNI, C. et al. Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 66, n. 18, p. 2985–3008, set. 2009.
- LASSALLE, P. et al. Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor-alpha. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 94, n. 1, p. 105–110, 1993.
- LAUTNER, R. Q. et al. Discovery and Characterization of Alamandine A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circulation research*, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, 2013.
- LAZARONI, T. L. N. et al. Angiotensin-(1–7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 97, n. 1, p. 113–123, jan. 2012.
- LECHIN, F. et al. (1998) The serotonin uptake-enhancing drug tianeptine suppresses asthmatic symptoms in children. A double-blind, crossover placebo-controlled study, *Journal of Clinical Pharmacology*, 38, 918–925
- LEDOUX JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:155-84.
- LI, W. et al. Imbalance between angiotensin II and angiotensin-(1–7) in human coronary atherosclerosis. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, v. 17, n. 3, p. 1470320316659618, 2016.
- LINDVALL O, BJÖRKLUND A, SKAGERBERG G. Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res.* 1984 Jul 23;306(1-2):19-30.
- LIU, B.; LIU, J.; WANG, M.; ZHANG, Y.; LI, L. From serotonin to neuroplasticity: Evolvement of theories for major depressive disorder. *Front. Cell. Neurosci.* 2017, 11, 305.
- LOCHHEAD JJ, THORNE RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 May 15;64(7):614-28. Epub 2011 Nov 15.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Current Pharmaceutical Design*, v. 15, n. 14, p. 1563–1586, 2009.
- LU, W. et al. Angiotensin-(1–7) inhibits inflammation and oxidative stress to relieve lung injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, n. 10, 2016.
- MAES et al. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine.* 1998 Apr;10(4):313-8.

- MAGALHÃES, G. S. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation: Angiotensin-(1-7) attenuates chronic asthma. *British Journal of Pharmacology*, v. 172, n. 9, p. 2330–2342, maio 2015.
- MAGALHAES, G. S. et al. Angiotensin-(1–7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 29 jan. 2018.
- MAGALHÃES, G. S. et al. Chronic allergic pulmonary inflammation is aggravated in angiotensin-(1–7) Mas receptor knockout mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 311, n. 6, p. L1141–L1148, 1 dez. 2016.
- MAGALHÃES, G. S. et al. Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Promotes Therapeutic Actions in a Model of Eosinophilic and Neutrophilic Asthma. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, 8 mar. 2021
- MAGALHÃES, G. S. et al. Treatment with inhaled formulation of angiotensin-(1-7) reverses inflammation and pulmonary remodeling in a model of chronic asthma. *Immunobiology*, v. 225, n. 3, p. 151957, maio 2020.
- MANRIQUE, C. et al. The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. *Medical Clinics of North America*, v. 93, n. 3, p. 569–582, 2009.
- MARSHALL, R. P. et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 286, n. 1, p. L156-164, jan. 2004.
- MARTINS LIMA A. et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis attenuates the cardiac reactivity to acute emotional stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Oct 1;305(7):H1057-67.
- MEREDITH, M. E.; SALAMEH, T. S.; BANKS, W. A. Intranasal Delivery of Proteins and Peptides in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *The AAPS Journal*, v. 17, n. 4, p. 780–787, 1 jul. 2015.
- METZGER R. et al. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett* 357: 27–32, 1995.
- MICHOPOULOS, V. et al. Inflammation in fear-and anxiety-based disorders: PTSD, GAD, and beyond. *Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 1, p. 254–270, 2017.
- MIKUNI, M., KAGAYA, A., TAKAHASHI K. & MELTZER, H. Y. (1992) Serotonin but not norepinephrine-induced calcium mobilization of platelets is enhanced in affective disorders, *Psychopharmacology*, 106, 311–314.
- MILLAR EA, et al. Activity of the renin-angiotensin system in acute severe asthma and the effect of angiotensin II on lung function. *Thorax*. 49(5): 492-495, 1994.
- MILLAR, E. A.; NALLY, J. E.; THOMSON, N. C. Angiotensin II potentiates methacholine-induced bronchoconstriction in human airway both in vitro and in vivo. *The European Respiratory Journal*, v. 8, n. 11, p. 1838–1841, nov. 1995.

- MILLER AH, MALETIC V, RAISON CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009 May 1;65(9):732-41.
- MILLER, H. E.; DEAKIN, J. F.; ANDERSON, I. M. Effect of acute tryptophan depletion on CO₂-induced anxiety in patients with panic disorder and normal volunteers. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, v. 176, p. 182–188, fev. 2000.
- MOORE, Keith. *Anatomia orientada para clínica*. 4^a ed. 2001. Editora Guanabara Koogan. Pg 905.
- MOZZINI MONTEIRO, T. et al. Anti-asthmatic and anxiolytic effects of *Herissantia tiubae*, a Brazilian medicinal plant. *Immunity, Inflammation and Disease*, v. 4, n. 2, p. 201–212, 2016.
- MUCIDA, D. et al. Unconventional strategies for the suppression of allergic asthma. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, v. 2, n. 2, p. 187–195, 2003.
- MYOU S, et al. Effect of candesartan, a type 1 angiotensin II receptor antagonist, on bronchial hyper-responsiveness to methacholine in patients with bronchial asthma. *J Clin Pharmacol*. 54: 622–626, 2002
- NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. *Neuron*, v. 34, n. 1, p. 13–25, 28 mar. 2002.
- NICKEL, T. et al. (2003) Clinical and neurobiological effects of tianeptine and paroxetine in major depression, *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 23(2), 155–168.
- NIETO-POSADAS A, et al. O ácido lisofosfatídico ativa diretamente o TRPV1 através de um sítio de ligação C-terminal. *Nat. Chem. Biol*. 2012; 8 :78–85.
- NONAKA, N. et al. Intranasal Administration of PACAP: Uptake by Brain and Brain Region Targeting with Cyclodextrins. *Peptides*, v. 36, n. 2, p. 168–175, ago. 2012.
- NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, v. 17, p. 528–543, set. 2014.
- NUTT, D. J. et al. Generalized anxiety disorder: comorbidity, comparative biology and treatment. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 5, n. 4, p. 315–325, 2002.
- OCARANZA, M. P. et al. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension*, v. 48, n. 4, p. 572-8, Oct 2006. ISSN 1524-4563.
- OKUYAMA, S. et al. Reduction of depressive-like behavior in mice lacking angiotensinogen. *Neuroscience letters*, v. 261, n. 3, p. 167–170, 1999.
- OLOFSSON PS, KATZ DA, ROSAS-BALLINA M, LEVINE YA, OCHANI M, VALDÉS-FERRER SI, PAVLOV VA, TRACEY KJ, CHAVAN SS. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) expression in bone marrow-derived non-T cells is required for the inflammatory reflex. *Mol Med*. 2012 May 9;18(1):539-43.
- 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, p. 606–618, ago. 2020.
- PAVLOV VA, TRACEY KJ. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Sep;61(18):2322-31.

- PAVLOV VA, WANG H, CZURA CJ, FRIEDMAN SG, TRACEY KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med.* 2003 May-Aug;9(5-8):125-34.
- PEACH MJ, DOSTAL DE. The angiotensin II receptor and the actions of angiotensin II. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 16(Suppl): S25-S30, 1990.
- PEETERS, B. W.; BROEKKAMP, C. L. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 49, n. 4–6, p. 417–427, jun. 1994.
- PHAM, X. et al. Association study between GABA receptor genes and anxiety spectrum disorders. *Depression and Anxiety*, v. 26, n. 11, p. 998–1003, 2009.
- PHILLIPS, M. I. et al. Dynamic changes in hypothalamic angiotensin II levels and release in association with progesterone-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, v. 132, n. 4, p. 1637–1642, abr. 1993.
- PITSAVOS et al., Anxiety in relation to inflammation and coagulation markers, among healthy adults: the ATTICA study. *Atherosclerosis*. 2006 Apr;185(2):320-6.
- PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 21 abr. 1977.
- PRETORIUS, E. (2007). Asthma medication and the role of serotonin in the development of cognitive and psychological difficulties. *Early Child Development and Care*, 175, 139 – 151.
- QADRI F, WOLF A, WALDMANN T, RASCHER W, UNGER T. Sensitivity of hypothalamic paraventricular nucleus to C- and N-terminal angiotensin fragments: vasopressin release and drinking. *J Neuroendocrinol.* 1998 Apr;10(4):275-81.
- REGENHARDT, R. W.; BENNION, D. M.; SUMNERS, C. Cerebroprotective action of angiotensin peptides in stroke. *Clinical Science*, v. 126, n. 3, p. 195–205, 1 fev. 2014.
- RESSLER, K. J. Amygdala Activity, Fear, and Anxiety: Modulation by Stress. *Biological psychiatry*, v. 67, n. 12, p. 1117–1119, 15 jun. 2010.
- RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety*, v. 12 Suppl 1, p. 2–19, 2000.
- RICE, G. I. et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochemical Journal*, v. 383, n. Pt 1, p. 45-51, Oct 2004. ISSN 1470-8728.
- RICHARDSON, VASKO, Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 839–845 (2002).
- ROBINSON, O. J. et al. The translational neural circuitry of anxiety. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v. 90, n. 12, p. 1353–1360, 2019.
- ROCHA, A. C. C. et al. Impacto dos transtornos depressivo e de ansiedade no controle da asma. *Revista de Medicina*, v. 100, n. 2, p. 128–134, 20 maio 2021.

- RODRIGUES-MACHADO, M. G. et al. AVE 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma: Mas agonist prevents asthma pulmonary remodelling. *British Journal of Pharmacology*, v. 170, n. 4, p. 835–846, out. 2013.
- ROSAS-BALLINA et al., Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*. 2011 Oct 7;334(6052):98-101.
- ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. *Psychological Review*, v. 105, p. 325–350, 1998.
- ŠAKIĆ, B. et al. Disturbed emotionality in autoimmune MRL-lpr mice. *Physiology & Behavior*, v. 56, p. 609–617, 1994.
- SALIM, S.; CHUGH, G.; ASGHAR, M. Inflammation in anxiety. *Advances in protein chemistry and structural biology*, v. 88, p. 1–25, 2012.
- SANTOS RA et al. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential target for new cardiovascular drugs. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 14(8):1019-1031, 2005.
- SANTOS, R. A. Angiotensin-(1–7). *Hypertension*, v. 63, n. 6, p. 1138–1147, 2014.
- SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 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, 1 jan. 2018.
- SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides*, v. 91, n. 1-3, p. 45-62, Jul 2000. ISSN 0167-0115.
- SCHATZBERG, A. F. et al. Toward a biochemical classification of depressive disorders. *Psychopharmacology*, v. 75, n. 1, p. 34–38, 1 out. 1981.
- SCHEUER, D. A.; PERRONE, M. H. Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *American Journal of Physiology*, v. 267, n. 1, p. R100–R104, 1994.
- SCHNIEDER, T.P. et al. Microglia of prefrontal white matter in suicide. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2014, 73, 880–890.
- SCHROTT, L. M.; CRNIC, L. S. Increased anxiety behaviors in autoimmune mice. *Behavioral Neuroscience*, v. 110, n. 3, p. 492–502, jun. 1996.
- SHENOY, V. et al. The Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1–7)/Mas Axis Confers Cardiopulmonary Protection against Lung Fibrosis and Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 182, n. 8, p. 1065–1072, 15 out. 2010.
- SHIM, H. S. et al. Role of astrocytic GABAergic system on inflammatory cytokine-induced anxiety-like behavior. *Neuropharmacology*, v. 160, p. 107776, 1 dez. 2019.

- SILVA, C. et al. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, p. 125–140, jun. 2002.
- SILVA, N. F. Associação entre variáveis psicológicas e asma: uma revisão de literatura. *Psicologia em Revista*, v. 18, n. 2, p. 293–315, ago. 2012.
- SILVEIRA, K. D. et al. Beneficial Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Mas Receptor in a Murine Model of Adriamycin-Induced Nephropathy. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. e66082, 7 jun. 2013.
- STECKLER, T.; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biological Psychiatry*, v. 46, p. 1480–1508, 1999.
- STEINER, J. et al. Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: Evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? *J. Neuroinflammation* 2011, 8, 94.
- STEPHAN, A.H.; BARRES, B.A.; STEVENS, B. The complement system: An unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 2012, 35, 369–389.
- SULSER, F.; WATTS, J.; BRODIE, B. B. On the mechanism of antidepressant action of imipraminelike drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 96, p. 279–288, 13 jan. 1962.
- SWANSON, L. W. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain research*, v. 217, n. 1, p. 150–154, 1981.
- TCHANTCHOU et al., Neuropathology and neurobehavioral alterations in a rat model of traumatic brain injury to occupants of vehicles targeted by underbody blasts. *Exp Neurol.* 2017 Mar;289:9-20.
- TEN BRINKE A, OUWERKERK ME, ZWINDERMAN AH, SPINHOVEN P, BEL EH. Psychopathology in patients with severe asthma is associated with increased health care utilization. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Apr;163(5):1093-6.
- THIERRY, B. et al. The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology*, v. 90, n. 2, p. 284–285, 1986.
- THOREN, C. T.; PETERMANN, F. Reviewing asthma and anxiety. *Respiratory Medicine*, v. 94, n. 5, p. 409–415, maio 2000.
- THORNE RG, HANSON LR, ROSS TM, TUNG D, FREY WH 2nd. Delivery of interferon-beta to the monkey nervous system following intranasal administration. *Neuroscience.* 2008 Mar 27;152(3):785-97.
- TILLER, J. W. G. Anxiety, perception and respiration. *Anxiety. Otago conference series*, No. 1. Dunedin, New Zealand: University of Otago Press, 1990. p. 151–158.
- TIPNIS, S. R. et al. A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 43, p. 33238–33243, out. 2000.
- TRACEY KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):853-9.

- TRÄNKNER D, HAHNE N, SUGINO K, HOON MA, ZUKER C. Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 5;111(31):11515-20.
- TSUJI F, AONO H. Role of transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and autoimmune diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2012 Aug 17;5(8):837-52.
- TYRER, P.; BALDWIN, D. Generalised anxiety disorder. *The Lancet*, v. 368, n. 9553, p. 2156–2166, 2006.
- UNDEM BJ, CARR MJ. The role of nerves in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002 Mar;2(2):159-65.
- VIAN, J. et al. The renin–angiotensin system: a possible new target for depression. *BMC Medicine*, v. 15, n. 1, dez. 2017.
- VICKERS C et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 277:14838–14843, 2002.
- VIEIRA, A. A. et al. Anxiety and depression in asthma patients: impact on asthma control. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 37, p. 13–18, 2011.
- VIEIRA, M. M. M. et al. Enhanced Th17 phenotype in individuals with generalized anxiety disorder. *Journal of Neuroimmunology*, v. 229, n. 1–2, p. 212–218, 15 dez. 2010.
- VOGELZANGS N, BEEKMAN AT, DE JONGE P, PENNING BW. Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort. *Transl Psychiatry*. 2013 Apr 23;3(4):e249.
- VOISIN, T.; BOUVIER, A.; CHIU, I. M. Neuro-immune interactions in allergic diseases: novel targets for therapeutics. *International Immunology*, v. 29, n. 6, p. 247–261, jun. 2017.
- WAGNER EY et al., Evidence for chronic low-grade systemic inflammation in individuals with agoraphobia from a population-based prospective study. *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4):e0123757.
- WALTHER, T. et al. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the *thymoma protooncogene*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 19, p. 11867–11873, 1998.
- WANG, L. et al. Increasing brain angiotensin converting enzyme 2 activity decreases anxiety-like behavior in male mice by activating central Mas receptors. *Neuropharmacology*, v. 105, p. 114–123, jun. 2016.
- WENZEL SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012 May 4;18(5):716-25.
- WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T. A. *Farmacologia ilustrada*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- WHITTAKER, L. et al. Interleukin-13 Mediates a Fundamental Pathway for Airway Epithelial Mucus Induced by CD4 T Cells and Interleukin-9. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 27, n. 5, p. 593–602, nov. 2002.
- WILKINSON-BERKA, J. L. Prorenin and the (pro) renin receptor in ocular pathology. *The American Journal of Pathology*, v. 173, n. 6, p. 1591–1594, 2008.

- WITTCHEN, H.-U.; FEHM, L. Epidemiology, patterns of comorbidity, and associated disabilities of social phobia. *Psychiatric Clinics*, v. 24, n. 4, p. 617–641, 2001.
- YANG, R.-F. et al. Angiotensin-(1–7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 300, n. 1, p. C58–C64, jan. 2011.
- YVAN-CHARVET L, QUIGNARD-BOULANGE A. Role of adipose tissue renin–angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Kidney International* 79, 162–168, 2011.
- ZAIDAN, I. et al. Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis. *JCI Insight*, v. 7, n. 1, 11 jan. 2022.
- ZHANG, L. et al. Depressive symptom-associated IL-1 β and TNF- α release correlates with impaired bronchodilator response and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 49, n. 6, p. 770–780, 2019.
- Zhuang, T.T., Pan, C., Chen, J.J., Han, F., Zhu, X.L., Xu, H., Lu, Y.P., 2018. Chronic asthma-induced behavioral and hippocampal neuronal morphological changes are concurrent with BDNF, cofilin1 and Cdc42/RhoA alterations in immature mice. *Brain Res. Bull.* 143, 194–206
- ZORRILLA EP et al. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun.* 2001 Sep;15(3):199-226.

9. ANEXOS

Anexo I

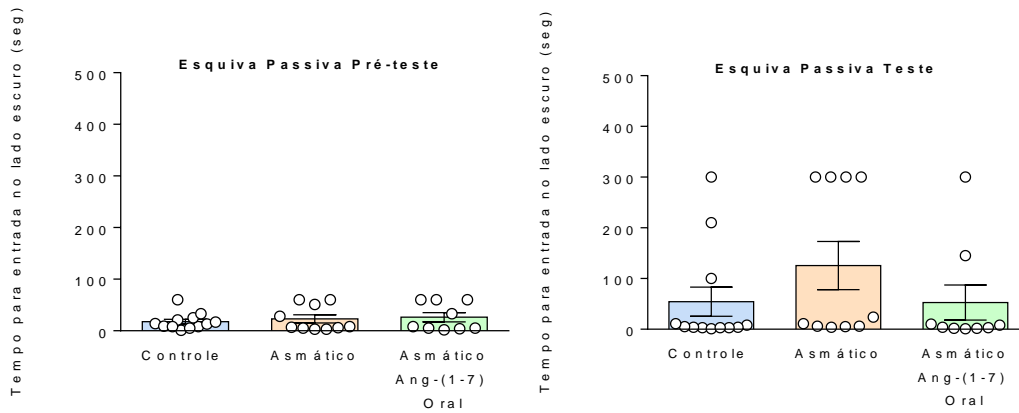


Figura 1A. Teste comportamental de esquiva passiva. Inicialmente cada camundongo foi familiarizado com o aparato de teste que consiste em uma caixa de acrílico (45 x 20 x 20) dividido em dois compartimentos separados por uma porta deslizante. Um dos compartimentos, correspondente a 2/3 do tamanho da caixa, é todo fechado e compreende o lado escuro do aparato. O outro compartimento, correspondente a 1/3 do tamanho da caixa, é aberto na parte superior e iluminada por uma luminária, lado claro. Ao serem colocados no compartimento claro, geralmente os animais passam rapidamente para o compartimento mais seguro, ou seja, o lado escuro. No 18º dia de protocolo, cada animal era colocado no compartimento claro e a latência para entrar no compartimento escuro era mensurada (1 minuto de corte). Uma vez no compartimento escuro, a porta de ligação era fechada e o animal recebia uma nebulização com OVA (2,5%) durante 10 minutos como estímulo aversivo. No dia seguinte (19º), o teste era repetido e a latência para a passagem para o compartimento escuro foi registrada (corte 5 minutos). Geralmente, os animais que exibem comportamento do tipo ansioso apresentam maior latência durante o teste em relação ao treino. Os gráficos apresentam a latência para passar para o compartimento escuro da caixa (Time, seg) no pre-teste e no dia do teste em animais controle, asmáticos e animais asmáticos que

receberam Ang-(1-7) por via oral ($60\mu\text{g}/\text{kg}$). $n=7-10$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

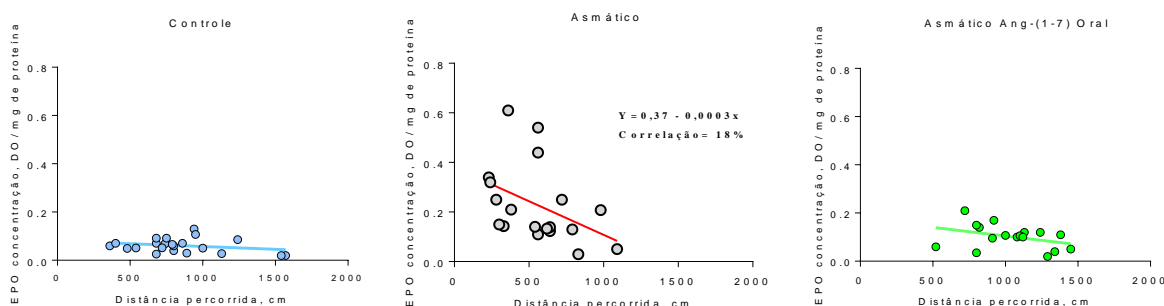


Figura 2A. Correlação entre parâmetros inflamatório e comportamental. Os gráficos apresentam a correlação entre parâmetros de inflamação e ansiedade. No eixo X está representado o teste utilizado para avaliação do comportamento do tipo ansioso em campo aberto, parâmetro de locomoção, enquanto o eixo Y representa o parâmetro inflamatório, a medida indireta de eosinófilos no pulmão através da concentração de EPO. Para esta análise incluímos os animais citados nos resultados 5.1. (protocolo para tratamento via oral) e 5.2. (protocolo para tratamento via intranasal). Os gráficos apresentam os animais controle, asmáticos e animais asmáticos que receberam Ang-(1-7) por via oral ($60\mu\text{g}/\text{kg}$) e via intranasal ($30\mu\text{g}/\text{kg}$); $n=17-27$. O grupo de animais asmáticos apresentou uma correlação estatisticamente significante $p= 0,0212$ entre os parâmetros avaliados, indicando que os maiores níveis de inflamação estão correlacionados com maior comportamento do tipo ansioso. Vale mencionar que para o teste de campo aberto, a relação entre a locomoção e ansiedade é proporcionalmente inversa, ou seja, quanto menor a exploração do ambiente, mais ansiosos os animais estão. (Controle $p= 0,2539$ e Ang-(1-7) $p= 0,1445$; Correlação de Pearson).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 290/ 2018

Título do projeto: Caracterização do efeito da angiotensina-(1-7) sobre distúrbios de comportamento de animais com inflamação pulmonar alérgica

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Maria Jose Campagnole dos Santos

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Fisiologia e Biofísica

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 01/10/2018. Validade: 01/10/2018 à 30/09/2023 RECOMENDAÇÃO: Recomenda-se que o tramadol seja administrado na dose de 12,5mg/kg, pelas vias subcutânea ou intraperitoneal (GUIA DE ANESTESIA E ANALGESIA PARA RATOS E CAMUNDONGOS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. 2016).

Belo Horizonte, 01/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br