

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Deborah Teixeira

**QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓINFLAMATÓRIAS EM  
HIPOTÁLAMO E HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A ESTRESSE  
CRÔNICO: PARTICIPAÇÃO DA ANGIOTENSINA II**

Porto Alegre

2011

Deborah Teixeira

**QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓINFLAMATÓRIAS EM  
HIPOTÁLAMO E HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A ESTRESSE  
CRÔNICO: PARTICIPAÇÃO DA ANGIOTENSINA II**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de bacharel em Biomedicina

Área de atuação: Fisiologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Co-orientador: Msc. Cláudio Felipe Kolling da Rocha

Porto Alegre

2011

Dedico este trabalho aos meus pais, Dóres e Sérgio – que me deram todas as oportunidades, inclusive a maior de todas (a vida), e à minha irmã Bárbara, por todos os anos de companheirismo.

## **Agradecimentos**

Agradeço:

Aos meus avós Alfredo (*in memorian*) e Erna, José (*in memorian*) e Herlita (*in memorian*), Iedo e Glória, por zelarem por meu bem-estar e me incluírem em suas orações.

Aos meus tios e primos, pela torcida.

Ao Professor Gilberto Sanvitto, pela confiança e pela orientação.

Ao Cláudio Felipe, por toda a ajuda, disponibilidade, dedicação, atenção e amizade, desde a elaboração do projeto, passando pela execução e finalização.

Ao Adolfo, à Amanda, ao Bruno e à Silvana, pela amizade, alegria compartilhada e palavras de conforto nos momentos difíceis.

A todos os colegas do laboratório 11, que de alguma forma contribuíram para que o meu trabalho de conclusão de curso fosse feito.

À Leila e à Vivian, que tornaram as aulas mais prazerosas, e pela amizade dentro e fora dos portões da UFRGS. A todos os colegas de faculdade, que amenizaram o 'fardo' da graduação.

Aos amigos que entenderam a minha ausência e, comigo, aguardaram esse momento.

Ao meu sincero e fiel amigo Floquinho(*in memorian*)! Quem esteve comigo durante as horas de estudo, pacientemente aguardando o término das minhas atividades, para então solicitar minha atenção.

## Índice geral

Agradecimentos.....	3
Lista de figuras.....	5
Resumo .....	7
1. Introdução.....	8
1.1. Estresse.....	8
1.2. Angiotensina II .....	11
1.3. Citocinas.....	13
1.3.1 Interleucina 1 $\beta$ .....	15
1.3.2 Interleucina 6 .....	16
1.3.3 Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ .....	16
2. Artigo Científico.....	18
3. Figuras.....	34
4. Conclusões e perspectivas .....	40
5. Referências Bibliográficas.....	41

## **Lista de figuras**

Figura 1: Quantificação da citocina IL-1 $\beta$  em hipocampo.

Figura 2: Quantificação da citocina IL-6 em hipocampo.

Figura 3: Quantificação da citocina TNF- $\alpha$  em hipocampo.

Figura 4: Quantificação da citocina IL-1 $\beta$  em hipotálamo.

Figura 5: Quantificação da citocina IL-6 em hipotálamo.

Figura 6: Quantificação da citocina TNF- $\alpha$  em hipotálamo.

## **Lista de abreviaturas**

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

Ang II: Angiotensina II

AVP: Arginina-vasopressina

BHE: Barreira hemato-encefálica

CRH: Hormônio liberador de corticotrofina

Eixo HPA: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

IL-1: Interleucina 1

IL1- $\alpha$ : Interleucina-1 $\alpha$

IL1- $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$

IL-6: Interleucina 6

LC: Locus coeruleus

LC/NA: Locus coeruleus/ noradrenalina

NA: Noradrenalina

PVN: Núcleo paraventricular

SFO: Órgão subfornicial

SI: Sistema imunológico

SNC: Sistema nervoso central

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## **Resumo**

Uma adaptação inadequada ao estresse executa importante papel na fisiopatologia de inúmeras doenças altamente prevalentes nos dias atuais. A angiotensina II (Ang II) exerce função tanto na resposta ao estresse, quanto na resposta pró-inflamatória do organismo (que também faz parte dos mecanismos de adaptação ao estresse). Para avaliar a participação da Ang II na modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos a estresse crônico, fez-se o tratamento com Losartan. As estruturas foram coletadas, para quantificação de citocinas por ELISA. Foi verificado que há significativo aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$  no hipocampo do grupo que ingeriu Losartan mas não foi submetido a estresse. Por outro lado, o grupo estressado, sem o fármaco, apresentou diminuição da expressão de IL-1 $\beta$ , que foi prevenida pela administração do bloqueador.

**Palavras-chave:** *Estresse crônico, Angiotensina II, citocinas pró-inflamatórias, IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ .*

## 1. Introdução

### 1.1. Estresse

A exposição a condições hostis (usualmente referidas como estressoras) resulta em uma série de modificações coordenadas no organismo, a fim de possibilitar a manutenção da homeostase. Essas respostas coordenadas, ou respostas ao estresse, são compostas de alterações no comportamento, função autônoma, e a secreção de vários hormônios, incluindo o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol/corticosterona (em roedores), catecolaminas adrenais, ocitocina, prolactina e renina [1].

Estressores podem ser definidos como as condições que põe em risco (ou parecem pôr em risco) a sobrevivência de um indivíduo. Em geral, esses estressores podem ser agrupados em três categorias abrangentes: (1) estressores psicológicos, baseados na resposta aprendida de uma ameaça iminente de situação adversa (medo, ansiedade, exposição a um ambiente novo ou incontrolável); (2) estressores que consistem em estímulos físicos e têm um forte componente psicológico (dor, choque na pata, imobilização); (3) estressores que desafiam a homeostase cardiovascular (hemorragia, estresse ortostático). [1]

Algumas das mudanças fisiológicas associadas ao estresse incluem a mobilização de energia para a manutenção das funções muscular e cerebral, atenção focada para perceber a ameaça, aumento dos índices de perfusão cerebral e utilização cerebral de glicose, aprimoramento da função

cardiovascular e respiração, e redistribuição da circulação sanguínea, aumentando a entrega de substrato e energia ao cérebro e aos músculos, modulação da função imune, inibição da fisiologia reprodutiva e decréscimo da alimentação e apetite. [2]

Várias estruturas centrais estão envolvidas na resposta a estímulos estressores fisiológicos e psicológicos, como córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e septo, juntamente com as fibras nervosas que transportam o estímulo sensorial, lançam aferências ao núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), indicado como um último integrador da resposta ao estresse. São as células do PVN que produzem vários peptídeos como arginina, vasopressina e o hormônio liberador de corticotrofina (CRH)[3, 4]. Esses neurônios projetam-se para a zona externa da eminência média do hipotálamo, sendo que os peptídeos são liberados no sistema porta-hipofisário, resultando na liberação de vários outros hormônios pela hipófise, como o ACTH. O ACTH, por sua vez, estimula um aumento de glicocorticóides na circulação [5]. Os glicocorticóides podem ter ações em diferentes regiões do organismo, inclusive no sistema nervoso central, sendo que o término da resposta aos glicocorticóides é dada por um eficiente sistema de retroalimentação negativa, envolvendo amígdala, hipotálamo, hipocampo e hipófise[6].

Outra região central importante na resposta ao estresse é o locus coeruleus. Juntamente com outros grupos celulares noradrenérgicos da medula e da ponte, constituem o sistema locus coeruleus/noradrenalina (LC/NA). A noradrenalina cerebral atua diminuindo funções neurovegetativas, tais como alimentação e sono, e contribui para o aumento

das respostas autonômicas e neuroendócrinas ao estresse, incluindo ativação do eixo HPA. Existem conexões neuronais recíprocas entre o CRH e o sistema LC/NA, com conseqüente estimulação recíproca.[4]

A ação do organismo, na situação de estresse, é de facilitar as funções neurais para garantir um estado de atenção mais eficaz. Por outro lado, há inibição de funções vegetativas, como apetite, alimentação e reprodução. Então, a energia é redistribuída, de modo a favorecer um maior aporte de oxigênio e nutrientes para músculos e sistema nervoso central [7].

Inicialmente, pensava-se que o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) fosse o único estimulador da liberação de ACTH pela hipófise. Atualmente se sabe que, embora ele tenha um papel proeminente na mediação da resposta ao estresse, atuando sobre o eixo HPA, e na coordenação das respostas endócrinas, autônomas, comportamentais e imunológicas[9, 10, 11, 12], existem inúmeras outras moléculas atuando nessa função. Nesse contexto, destaca-se o hormônio angiotensina II (Ang II), que tem sua concentração tanto periférica quanto central aumentadas, tanto nas respostas ao estresse agudo, quanto no estímulo crônico [13].

A ação da angiotensina na região parvocelular do PVN durante o estresse, estimula a síntese e liberação de CRH [14]. Sinergicamente, a arginina-vasopressina (AVP) age com o CRH, modulando a liberação de ACTH pelos adrenocorticotrofos na adeno-hipófise.[15] Contudo, se, por um lado, há na resposta aguda a um estressor, uma sutil elevação de AVP e forte elevação de CRH, no estresse crônico, a resposta hipotalâmica se

diferencia por apresentar forte elevação de AVP e discreta elevação dos níveis de CRH [16].

O estresse por contenção, paradigma de estresse utilizado nesse trabalho, está caracterizado como estresse psicológico, podendo levar a alterações neuroquímicas e/ou comportamentais, muitas vezes indesejáveis, que estão intimamente ligadas com a duração e intensidade do evento estressor. Como exemplo, pode-se dizer que uma exposição prolongada a glicocorticóides causa uma regulação negativa dos receptores de glicocorticóides no hipocampo, estrutura mais importante na regulação do eixo [17] prejudicando a retroalimentação negativa que esses hormônios exercem no eixo HPA. Adicionalmente, vários estudos vêm apontando os efeitos neurotóxicos da exposição prolongada a glicocorticóides (danos que podem se manifestar em diversos níveis, como atrofia celular, ou mesmo morte neuronal) [18].

## **1.2. Angiotensina II**

O octapeptídeo Angiotensina II (Ang II), foi descoberto como um agente pró-hipertensivo de origem periférica [19] que faz parte de um sistema clássico descrito em mamíferos. Esse sistema é caracterizado por uma molécula precursora – o angiotensinogênio - , predominantemente produzido no fígado e liberado na circulação. O angiotensinogênio, por sua vez, é clivado pela renina (enzima produzida pelo rim e liberada na circulação), formando o decapeptídeo precursor inativo Angiotensina I. A Angiotensina I presente na circulação é convertida a Angiotensina II pela

enzima conversora de angiotensina (ECA), predominantemente presente nas superfícies das células endoteliais nos pulmões. A angiotensina II circulante produz vasoconstrição, retenção de sódio e água, consolidando um papel-chave na regulação da homeostase e da pressão sanguínea. [20]

As ações fisiológicas da Ang II acontecem por meio de dois receptores, AT1 e AT2 [21], que estão amplamente distribuídos pelo SNC, incluindo-se aí núcleos angiotensinérgicos, como o órgão subfornicial (SFO). Esse núcleo apresenta uma alta densidade de receptores AT1, e está situado fora da barreira hemato-encefálica (BHE).

Atualmente, sabe-se que há um sistema angiotensinérgico cerebral endógeno[22]. O uso de técnicas sensíveis e quantitativas, permitiu a localização e caracterização dos receptores de Angiotensina II no cérebro. Vários estudos demonstram que a ANG II se liga a sítios em regiões cerebrais específicas, havendo vários receptores localizados dentro da barreira hemato-encefálica que não são acessíveis ao peptídeo circulante. A maioria dos receptores se encontra em áreas envolvidas com a regulação endócrina e autonômica, percepção sensorial e comportamento emocional [23].

A Ang II tem sido relacionada fortemente ao estresse, visto que já foi observada sua concentração aumentada logo após situação estressante [24]. O estresse agudo aumenta o conteúdo de Ang II em muitas regiões do cérebro (incluindo o hipotálamo), além de aumentar a expressão do receptor AT1 na porção parvocelular do núcleo paraventricular, na eminência mediana do hipotálamo, na hipófise anterior, entre outros [25]. Além disso, a

Ang II tem sido descrita como uma ativadora celular, regulando a expressão de várias substâncias, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, que estão envolvidas em crescimento e proliferação celular, resposta inflamatória e estresse oxidativo, principalmente através dos seus receptores AT1. [21]

Vários estudos apontam a Ang II como efetora importante em eventos do processo inflamatório [25], promovendo síntese e liberação de citocinas e radicais livres [26, 27] que podem acarretar destruição celular e tecidual. Por outro lado, os efeitos biológicos da AngII não são dependentes apenas das concentrações locais ou sistêmicas desse hormônio, mas também da densidade de receptores para esse agente nas superfícies das células-alvo. Porém, o mecanismo de regulação da expressão de AT1 é pouco conhecido.[28]

### **1.3. Citocinas**

Citocina é um termo genérico, usado para designar um grande grupo de proteínas solúveis e peptídeos responsáveis pela comunicação intercelular; no sistema imune, são reguladoras centrais de crescimento e diferenciação de leucócitos, são produzidas por vários tipos celulares, e têm inúmeros alvos, em todas as regiões do organismo. As citocinas agem em um espectro celular maior do que os hormônios, mas não são produzidas por glândulas delimitadas, e sim por células do sistema imune e também do sistema nervoso central, principalmente pelas células da glia [29].

Mais de cem citocinas humanas já foram identificadas e, para simplificar o seu entendimento, foram divididas em superfamílias estruturais. Atualmente, diversos estudos relacionam a presença de citocinas, em fluidos corporais, com a patogênese de inúmeros distúrbios, inclusive do sistema nervoso central. As citocinas interagem com o SNC em diferentes níveis, como o neuroendócrino, incluindo o eixo HPA, e inervação simpática de órgãos linfóides, e estão envolvidos na resposta imune, tanto humoral como celular. [30] Por sua vez, o sistema imune influencia o SNC primordialmente através de citocinas.

Citocinas influenciam mecanismos que se utilizam de vários circuitos neurais, como apetite, termorregulação, padrões de comportamento e de sono. Também há evidências da participação das citocinas em mecanismos de memória e aprendizado. Por conseguinte, estudos demonstram a presença de receptores funcionais para citocinas ao longo do SNC, em astrócitos, microglia, oligodendrócitos, e na maioria dos neurônios.[31, 32]. Diversas citocinas foram encontradas no cérebro, sendo que há expressão constitutiva de IL-1  $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no SNC. Embora não haja consenso sobre onde estejam concentrados os receptores para essas citocinas, parece que, em ratos adultos, a maioria dos receptores para IL-1  $\beta$  se encontram no hipocampo. [33]

No início dos estudos sobre a relação neuroimunológica, acreditava-se que moléculas relativamente grandes como as citocinas (que podem ter de 15 a 20 kDa) não pudessem cruzar a barreira hemato-encefálica. Trabalhos recentes demonstram que as citocinas podem chegar ao SNC,

cruzando diretamente a barreira hemato-encefálica, ou indiretamente, sinalizando ao cérebro por meio de outras substâncias [34]. Desse modo, as interleucinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  podem influenciar a atividade neuroendócrina, promover a alteração de neurotransmissores centrais e induzir inúmeros sintomas e/ou modificações comportamentais [35].

### **1.3.1 Interleucina 1 $\beta$**

Interleucina 1 (IL-1) é uma citocina proinflamatória, produzida principalmente por monócitos e macrófagos na circulação periférica. Sua ação ocorre por meio da ligação dos agonistas (IL1- $\alpha$  ou IL1- $\beta$ ), a um receptor de superfície celular (IL1-R1), e necessita de associação a uma proteína acessória (Acp). Há também outro receptor (IL-R2), mas não participa da mesma forma na transdução de sinal.[36]

Embora esteja presente apenas em pequenas quantidades em estado basal, tanto ligantes quanto receptores de IL-1 podem ser expressos por células do SNC. Pouco se sabe sobre a regulação da expressão e a origem exata dessa citocina no SNC, mas a expressão já foi percebida em astrócitos, microglia, oligodendroglia, neurônios, células vasculares cerebrais e células imunes circulantes.

IL-1 é um potente defensor do hospedeiro frente a infecções e danos, tanto dentro quanto fora do SNC, participando do recrutamento celular e da manutenção da resposta inflamatória. Além disso, já foi verificada a sua participação em ações hipotalâmicas, como o apetite[37].

### 1.3.2 Interleucina 6

A IL-6 é uma citocina multifuncional, produzida por células T, monócitos e macrófagos, fibroblastos, hepatócitos e algumas células tumorais. A sua produção é regulada pela estimulação por antígeno, IL-1, fator de necrose tumoral, vírus, entre outros [38]. A IL-6 age estimulando a secreção de anticorpos pelas células B, e a produção de IL-2 pelas células T.

IL-6 exerce atividade sobre células tímicas maduras e linfócitos T periféricos. Essa citocina também estimula a produção de proteínas de fase aguda da inflamação pelos hepatócitos, e tem atividade de formação de colônia das células-tronco hematopoiéticas, entre outros. [39]

### 1.3.3 Fator de Necrose Tumoral $\alpha$

O TNF- $\alpha$  é produzido por neutrófilos, linfócitos T e B ativados, células *natural killers*, células endoteliais e células musculares. Ele possui ação pleiotrófica, podendo ativar múltiplas vias de transdução de sinal, induzir ou suprimir a expressão de vários genes, fatores de transcrição, mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda [40]. Muitas de suas ações têm função semelhante às da IL-1, como a resistência do hospedeiro à infecção. [41]

Diante da participação do estresse na modulação do conteúdo de citocinas próinflamatórias, e tendo em vista o importante papel da angiotensina II durante a resposta ao estresse, deseja-se verificar se há a

participação da angiotensina II nessa modulação, em hipocampo e hipotálamo.

## **2. Artigo Científico**

Artigo em preparação para publicação no periódico Life Sciences

**QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓINFLAMATÓRIAS EM  
HIPOTÁLAMO E HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDOS A ESTRESSE  
CRÔNICO: PARTICIPAÇÃO DA ANGIOTENSINA II**

Deborah Teixeira, Cláudio Felipe Kolling da Rocha, Gilberto Luiz Sanvito

Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS, Brasil

Autor Correspondente: Deborah Teixeira

e-mail: [dehteixeira@yahoo.com.br](mailto:dehteixeira@yahoo.com.br)

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500- Porto Alegre-RS

Fone: 55 51 3308 3578

## **Resumo**

Uma adaptação inadequada ao estresse executa importante papel na fisiopatologia de inúmeras doenças altamente prevalentes nos dias atuais. A angiotensina II (AngII) exerce função tanto na resposta ao estresse, quanto na resposta pró-inflamatória do organismo (que também faz parte dos mecanismos de adaptação ao estresse). Para avaliar a participação da Ang II na modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em hipocampo e hipotálamo de ratos submetidos a estresse crônico, fez-se o tratamento com Losartan. As estruturas foram coletadas, para quantificação de citocinas por ELISA. Foi verificado que há significativo aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$  no hipocampo do grupo que ingeriu Losartan mas não foi submetido a estresse. Por outro lado, o grupo estressado, sem o fármaco, apresentou diminuição da expressão de IL-1 $\beta$ , que foi prevenida pela administração do bloqueador.

**Palavras-chave:** *Estresse crônico, Angiotensina II, citocinas pró-inflamatórias, IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ .*

## 1.Introdução

A exposição a condições hostis (usualmente referidas como estressoras) resulta em uma série de modificações coordenadas no organismo, a fim de garantir a manutenção da homeostase. Essas respostas coordenadas, ou respostas ao estresse, são compostas de alterações no comportamento, função autônoma, e a secreção de vários hormônios, incluindo o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol/ corticosterona (em roedores), catecolaminas adrenais, ocitocina, prolactina e renina (Van der Kar & Blair, 1999).

Algumas das mudanças fisiológicas associadas ao estresse incluem a mobilização de energia para a manutenção das funções muscular e cerebral, atenção focada para perceber a ameaça, aumento dos índices de perfusão cerebral e utilização cerebral de glicose. Dessa forma, há aprimoramento da função cardiovascular e respiração, aumentando a entrega de substrato e energia ao cérebro e aos músculos, modulação da função imune, inibição da fisiologia reprodutiva e decréscimo da alimentação e apetite. (Habib et al, 2001)

Várias estruturas centrais estão envolvidas na resposta a estímulos estressores, como córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e septo, juntamente com as fibras nervosas que transportam o estímulo sensorial, lançam aferências ao núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), indicado como um último integrador da resposta ao estresse. As células do PVN produzem vários aminoácidos, como arginina, e peptídeos como vasopressina e o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (Chrousos,

1997 e 2002). Esses neurônios se projetam para a zona externa da eminência média do hipotálamo, sendo que os peptídeos são liberados no sistema porta-hipofisário, resultando na liberação de vários outros hormônios pela hipófise, como o ACTH. O ACTH, por sua vez, estimula um aumento de glicocorticóides na circulação. (Aguilera et al, 2001).

Sabe-se que CRH não é o único regulador da liberação de ACTH (Levens, 1990), embora ele tenha um papel proeminente na mediação dos efeitos das situações estressantes no eixo HPA, e na coordenação das respostas endócrinas, autônomas, comportamentais e imunológicas ao estresse. (Vale et al, 1981, Dunn & Berridge, 1990, de Souza, 1995, Sout et al, 2002,). Nesse contexto, destaca-se o hormônio angiotensina II (Ang II), que tem sua concentração tanto periférica quanto central aumentadas, tanto no estresse agudo quanto no estímulo crônico. (Castrén & Saavedra, 1998). A ação da angiotensina II na região parvocelular do PVN durante o estresse, estimula a síntese e liberação de CRH (Sumitomo et al, 1991). As ações fisiológicas da Ang II acontecem por meio de dois receptores, AT1 e AT2 (Ferrario, 2006), que estão amplamente distribuídos pelo SNC,

Vários estudos apontam a Ang II como efetora importante em eventos do processo inflamatório (Suzuki et al, 2003), agindo também como um mediador pró-inflamatório, promovendo a liberação de citocinas e radicais livres (Ruiz-Ortega et al, 2002, LiLua et al, 2004).

Este trabalho tem como objetivo verificar se há modificação da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , em hipocampo e hipotálamo, quando ratos submetidos a estresse por contenção diária,

durante sete dias, recebem tratamento com Losartan (antagonista AT1 de angiotensina II) na água de beber. Espera-se, assim, inferir se há a participação da angiotensina II na modulação da expressão desses fatores inflamatórios.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Animais**

A princípio, 40 ratos Wistar machos, obtidos do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram admitidos em nosso laboratório, com a idade de 75 dias. Após 15 dias de ambientação em nosso biotério, que possuía temperatura entre  $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , e ciclo claro/escuro de 12h, com luzes acesas às 5h da manhã, eles foram alocados em gaiolas metabólicas. Os resultados de consumo das gaiolas metabólicas servem para um outro projeto, que faz parte do mesmo grupo de pesquisa.

Os ratos foram divididos em quatro grupos: (1) controle, que não recebiam nem fármaco, nem estresse, (2) estresse, que recebiam apenas estresse, mas não tratamento com o fármaco, (3) estresse+losartan, que recebiam a intervenção de estresse e o tratamento com o fármaco, e (4) losartan, que não sofriam o estresse, mas recebiam tratamento com o fármaco.

A administração de Losartan, um antagonista de receptores AT1 de Ang II, foi feita com a diluição do fármaco na água de beber, na concentração de 0,1 mg/ml/kg de peso do animal (Cullman et al, 1999). Os

animais foram pesados diariamente para a correção da dose do fármaco, e a solução de administração era trocada a cada 24 horas.

Os animais submetidos ao estresse por contenção eram mantidos individualmente em um cilindro de acrílico (com 9 centímetros de largura e comprimento ajustável de acordo com o tamanho do animal), durante 1 hora, sempre no início da tarde (entre 13 e 14h). Esse procedimento se repetiu durante sete dias. (Ely et al, 1997)

## 2.2 Coleta de material e procedimentos de dosagem

Após 18 horas do último evento de contenção, os animais foram decapitados, e tiveram hipocampo e hipotálamo coletados, sobre uma superfície congelada. Seguiu-se o rápido congelamento das estruturas em isopentano refrigerado em gelo seco, e posterior armazenamento em freezer -80°C.

Para as dosagens, primeiro se fez a extração de proteínas. Para isso, os tecidos foram homogeneizados em 250µL de tampão contendo Tris HCl na concentração de 10mM e pH 7,4; EDTA 1mM, PMSF 0,001mM, pepstatina 1µg/mL e 1% Triton X 100. A mistura permaneceu 1 hora no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 25 minutos a 12000g. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de proteínas e também para os protocolos de ELISA. A concentração de proteína na amostra foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A quantificação de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) foi feita pelo teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), de acordo com o

protocolo do fabricante. Para a quantificação de IL-1 $\beta$  e IL-6 foi utilizado o kit Platinum ELISA da empresa eBioscience®; para a quantificação de TNF- $\alpha$ , foi utilizado o kit Enzo Life Sciences®.

### 2.3 Análise estatística

A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA) de duas vias, assumindo-se  $p < 0,05$ , e pós-teste de Bonferroni quando indicado. Para este fim, utilizou-se o programa GraphPad Prism 5®.

### 3.Resultados

Para IL-1 $\beta$  em hipocampo, não houve interação entre a intervenção (estresse) e o fármaco (Losartan) [F (1, 27)= 1,13;  $p = 0,2967$ ,  $n = 7-8$ ], o estresse não afetou os resultados [F (1, 27)= 0,27;  $p = 0,6086$ ;  $n = 7-8$ ], e nem houve alteração dos resultados pelo Losartan [F (1, 27)= 0,28;  $p = 0,6019$ ;  $n = 7-8$ ] (Figura 1). A análise de IL-6, também em hipocampo, mostra que não há interação entre estresse e losartan [F (1, 23)=0,97;  $p = 0,3356$ ;  $n = 6-8$ ], nem alteração dos resultados por Losartan [F (1, 23)= 1,52;  $p = 0,2297$ ;  $n = 6-8$ ]. Porém, embora o teste indicasse que o estresse tenha influenciado os resultados [F (1, 23)=4,44;  $p < 0,05$ ;  $n = 6-8$ ], essa alteração não foi confirmada pelo pós-teste (Figura 2). Nas análises realizadas para TNF- $\alpha$ , em hipocampo, verificou-se que há interação entre estresse e Losartan [F (1, 25)= 4,59;  $p < 0,05$ ;  $n = 6-9$ ], sendo que o estresse afeta os resultados [F (1, 25)=5,82;  $p < 0,05$ ;  $n = 6-9$ ], e o Losartan influencia nos resultados [F (1, 25)=8,87;  $p < 0,01$ ;  $n = 6-9$ ] (Figura 3).

Para IL-1 $\beta$  em hipotálamo, houve interação entre intervenção (estresse) e o fármaco (Losartan) [F (1, 27)=5,47; p<0,05; n=7-9], embora não tenha havido efeito do estresse [F (1, 27)=3,20; p=0,0849; n=7-9]. Por outro lado, o Losartan altera o resultado, revertendo o efeito do estresse [F (1, 27)= 5,59; p<0,05; n=7-9] (Figura 4). Para IL-6 em hipotálamo, houve interação entre estresse e Losartan [F (1, 21)= 4,91; p<0,05; n=6-7], mas não houve efeito do estresse [F (1, 21)= 0,00; p=0,9506; n=6-7] nem do Losartan [F (1, 21)= 2,13; p=0,1588; n=6-7] (Figura 5). Os resultados para TNF- $\alpha$  em hipotálamo, apontam que não houve interação entre estresse e Losartan [F (1, 16)= 0,27; p=0,6116; n=5-6], nem efeito do estresse [F (1, 16)= 0,49; p=0,4924; n=5-6], e também não há interferência do Losartan [F (1, 16)=1, 14; p=0,3016; n=5-6] (Figura 6).

#### **4.Discussão**

É de conhecimento geral que uma má adaptação ao estresse, alteração da função cerebrovascular, bem como inflamação cerebral excessiva, executam papéis expressivos na patofisiologia de inúmeras doenças psiquiátricas e neurológicas, como depressão maior, esquizofrenia, estresse pós-traumático, doenças de Parkinson e Alzheimer, entre outras. Nesse sentido, volta-se a atenção para o papel da Ang II sobre o SNC, e dos bloqueadores de receptores AT1. Isso porque o papel da AngII nas patologias cerebrais não está muito claro, embora recentes estudos apontam bloqueadores de receptor AT1 como mitigadores da progressão da doença de Alzheimer (Saavedra et al.,2010).

Embora a resposta imune seja essencial para a sobrevivência, um excesso de formação e secreção de mediadores inflamatórios e radicais livres podem levar a dano e morte celular. Além do mais, a liberação de restos celulares, bem como a formação de substâncias tóxicas, podem desencadear progressivas cascatas inflamatórias, bem como toxicidade celular (Licinio & Jong, 1997). Contudo, faz-se importante ressaltar que a inflamação cerebral não é necessariamente uma consequência de uma infecção por agente externo, podendo ser causada como uma resposta à produção de agentes neurotóxicos endógenos, ou alteração de rotas oxidativas (como, por exemplo, acontece no envelhecimento e/ou doenças neurodegenerativas) (Bhat & Steimann, 2009)

Por outro lado, embora se faça extensa pesquisa, buscando fármacos apropriados para desordens inflamatórias cerebrais, tem-se pouco sucesso nesse sentido. Por exemplo, fármacos utilizados para desordens inflamatórias periféricas, não são satisfatoriamente efetivas no cérebro (Nimmo & Vink, 2009). Ainda nesse sentido, várias alternativas farmacológicas propostas para o tratamento de desordens mentais estão muito longes de serem totalmente eficazes. (Saavedra, 2005)

Nesse trabalho, verificou-se que, a nível de hipocampo, não houve diferenças da expressão de IL1- $\beta$  entre os grupos analisados (figura 1). Também não há diferença da expressão de IL-6 entre os grupos (figura 2). Entretanto, animais que ingeriram Losartan, mas não sofreram estresse, apresentaram uma maior concentração de TNF- $\alpha$  do que os outros grupos (figura3). Durante períodos de neuroinflamação crônica, várias evidências

experimentais apontam TNF- $\alpha$  como um mediador essencial para a progressão de gliose, desmielinização, inflamação, deterioração da barreira hemato-encefálica e morte celular. Uma das funções mais bem estabelecidas do TNF é o de estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos ao local de infecção, e ativar as células, de forma parácrina, a eliminar o material exógeno (Montgomery & Blowers, 2011). A técnica utilizada nesse trabalho para a quantificação de TNF- $\alpha$  utiliza um homogeneizado de tecido, sugerindo que os valores obtidos expressam o conteúdo dessa citocina no hipocampo. Sugere-se fortemente, então, que a Ang II tenha uma ação inibitória tônica sobre o conteúdo de TNF- $\alpha$  nessa estrutura, evidenciando a sua participação na fisiologia da liberação de citocinas.

Já nos resultados para hipotálamo, percebemos que houve significativo decréscimo nas quantidades de IL-1 $\beta$  dos animais estressados, em comparação aos animais não-estressados. Decréscimo esse que foi evitado pela administração do fármaco ( $p < 0,01$ ) (figura 4). Os efeitos da IL-1 sobre o eixo HPA são primariamente estimulatórios, em todos níveis, e culminam no aumento da liberação de glicocorticóides pelo córtex das adrenais. Esses glicocorticóides agem, por meio de *feedback* negativo, diminuindo a produção de IL-1 (Turnbull et al, 1999). Por isso, pode ter havido manutenção dos baixos níveis de IL-1 $\beta$  em função de uma concentração mais elevada constante em glicocorticóides. Por outro lado, se o conteúdo de IL-1 $\beta$  em animais estressados está reduzido, pode-se sugerir que há maior liberação dessa citocina; fato que não ocorreu nos animais que

receberam a intervenção junto com Losartan. Essa citocina (principalmente em sua forma  $\beta$ ), provavelmente constitua a principal molécula capaz de modular funções cerebrais durante insultos inflamatórios (Rivest 2001).

Na quantificação de interleucina 6, no hipotálamo, percebe-se interação entre estresse e losartan. Não houve efeito do estresse, mas verifica-se que o grupo estressado que recebeu o fármaco tem quantidades significativamente menores de citocina IL-6, do que o grupo estressado sem o antagonista. (figura 5). Por outro lado, Não houve diferenças na quantificação de citocina TNF- $\alpha$  no hipotálamo, entre os grupos.

As citocinas pró-inflamatórias podem reforçar, ou mesmo atenuar os efeitos mediados pela Ang II, de formas diferentes, dependendo da natureza das células produtoras de citocina na lesão (Zhang & Sun, 2006). O microambiente das células e dos tecidos, incluindo suas matrizes extracelulares, íons, fatores de crescimento, entre outros, é altamente dinâmico. Por isso, parece que regular os receptores AT1 se torna complicado e não-determinante para a completa modulação da expressão de citocinas.

## **5. Conclusão**

Com este trabalho, conclui-se que, a nível de hipocampo em ratos Wistar adultos, há considerável aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$ , no grupo que ingeriu Losartan e não foi submetido à intervenção por estresse. Por outro lado, a nível de hipotálamo, o grupo estressado apresentou

diminuição estatisticamente significativa da expressão da citocina IL-1 $\beta$ .  
Diminuição essa que foi evitada com a administração da droga.

## **6. Agradecimentos**

Agradecemos ao CNPq/CAPES pelo apoio financeiro a este projeto.

## 7. Referências Bibliográficas

Aguilera, G., Rabadan-Diehl, C., Nikodemova, M., 2001. Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides* 22, 769– 774

Bhat, R., Steinman, L., 2009. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. *Neuron* 64, 123—132.

Bradford, M. M. (1976). "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* : 248–254(72): 248 - 254.

Castrén, E. & Saavedra, J.M. Repeated stress increases the density of Angiotensin II binding sites in the rat paraventricular nucleus and subfornical organ. *Endocrinology* 122(1): 370-2, 1988.

Chrousos, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptative response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851:311-35, 1998

Chrousos, G. P. Organization and integration of the endocrine system. *Pediatric Endocrinology*, ed. M Sperling, pp. 1-14. Philadelphia: Saunders, 2002.

Culman J, von Heyer C, Piepenburg B, Rascher W, Unger T Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to

angiotensin II in conscious, normotensive rats..Eur J Pharmacol. 1999 Feb 19;367(2-3):255-65

de Souza, E.B., 1995. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20, 789– 819.

Dunn, A.J., Berridge, C.W., 1990. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Rev.* 15, 71–100.

Ely DR, Dapper V, Marasca J, Corrêa JB, Gamaro GD, Xavier MH, Michalowski MB, Catelli D, Rosat R, Ferreira MB, Dalmaz C.Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav.* 1997 Mar;61(3):395-8

Ferrario CM. 2006. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7(1):3–14.

Habib, K.E., Gold, P.W., Chrousos, G.P., 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 30, 695– 728

Levens, N.R., 1990. Control of renal function by intrarenal angiotensin II in the dog. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 (Suppl. 4), S65–S69.

Licinio, J., Wong, M.-L., 1997. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 100: 2941—2947

Li Lua, Mark T. Quinnb, Yao Sun. 2004. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochem Biophys Res Commun* 325(3):943–951.

Montgomery SL, Bowers WJ. Tumor Necrosis Factor-alpha and the Roles it Plays in Homeostatic and Degenerative Processes Within the Central Nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011 Jul 5

Nimmo, A.J., Vink, R., 2009. Recent patents in CNS drug discovery: the management of inflammation in the central nervous system. *Recent Pat. CNS Drug Discov*. 4, 86—95.

Rivest S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.. *Psychoneuroendocrinology*. 2001 Nov;26(8):761-88. Review

Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J. 2002. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl* 82:S12–S22.

Saavedra, J.M., 2005. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell. Mol. Neurobiol*. 25, 485—512.

Saavedra, J.M., et al., Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology*(2010),doi:10.1016/j.psyneuen.2010.10.001

Stout, S.C., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2002. Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal systems and hypothalamic– pituitary–adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 1085–1092.

Sumitomo T, Suda T, Nakano Y, Tozawa F, Yamada M, Demura H  
Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Endocrinology.* 1991 May;128(5):2248-52

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. 2003. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35(6):881–900.

Turnbull, A. V. e River, C. L., 1999. "Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action." *Physiological Reviews* 79(1): 1-71.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J., 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394–1397

Van de Kar, L.D., Blair, M.L., 1999. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 1 – 48.

Zhang H, Sun GY. 2006. Expression and regulation of AT1 receptor in rat lung microvascular endothelial cell. *J Surg Res* 134(2):190–197

### 3. Figuras

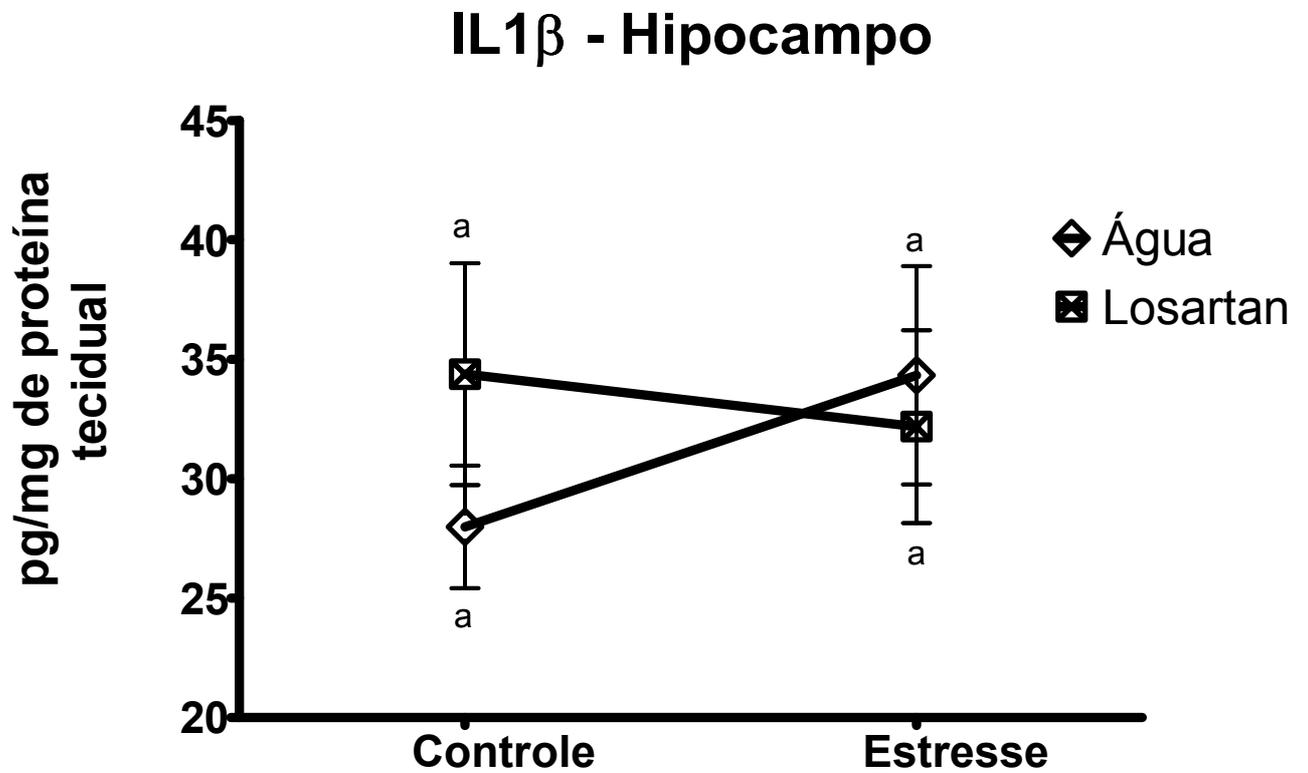


Figura 1: Quantificação de IL-1  $\beta$  em hipocampo. Dados analisados por ANOVA de duas vias, expressos em média  $\pm$  EPM.

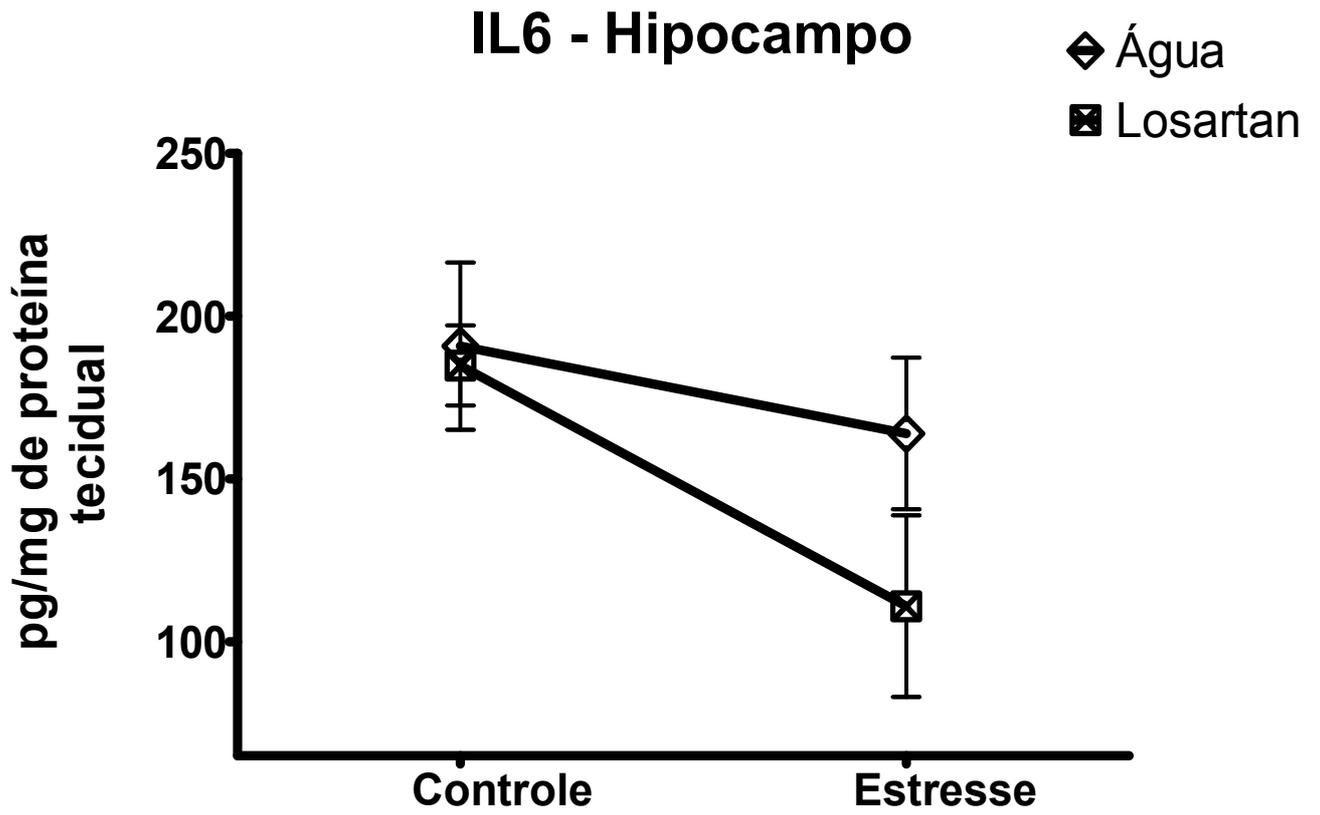


Figura 2: Quantificação de IL-6 em hipocampo. Dados analisados em Anova de duas vias, expressos em média  $\pm$  EPM.

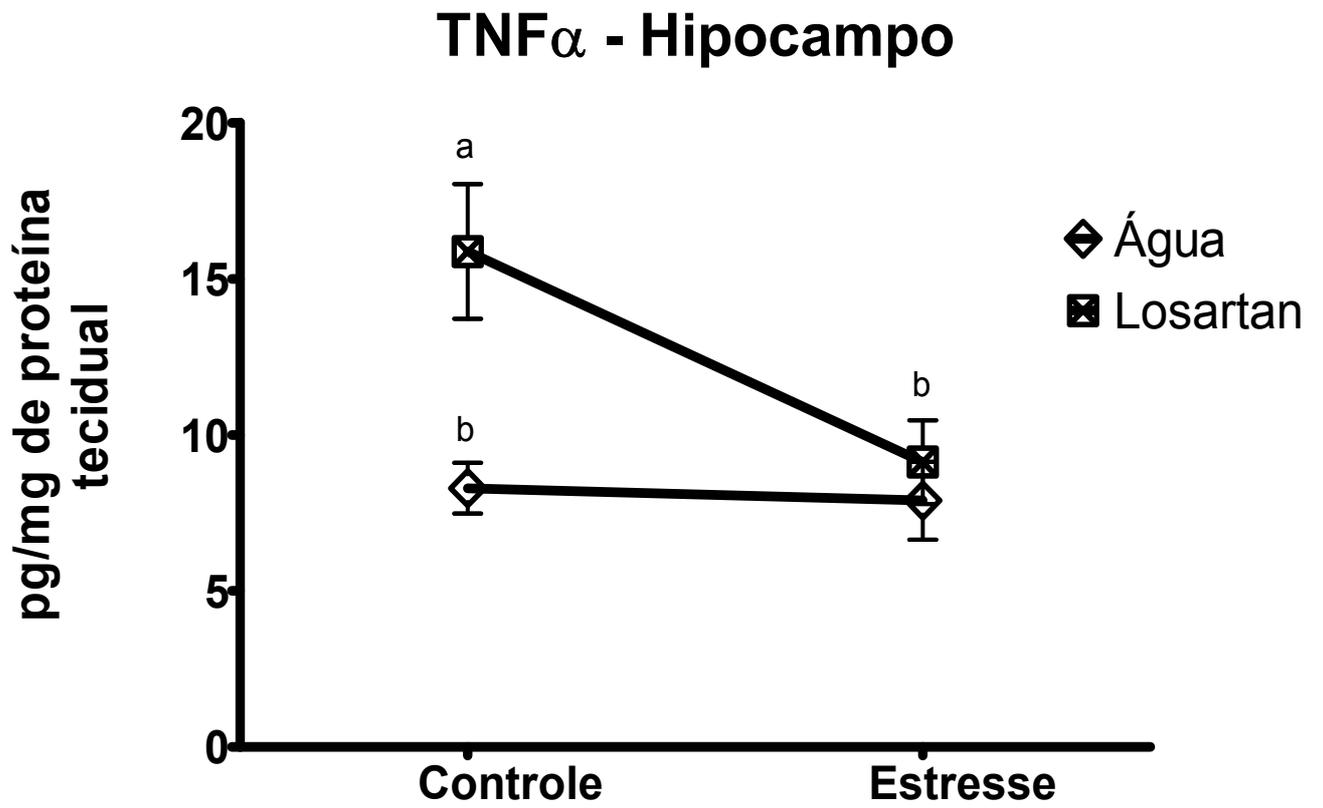


Figura 3: Quantificação de TNF- $\alpha$  em hipocampo. Dados analisados por ANOVA de duas vias, expressos em média  $\pm$  EPM.

## IL1 $\beta$ - Hipotálamo

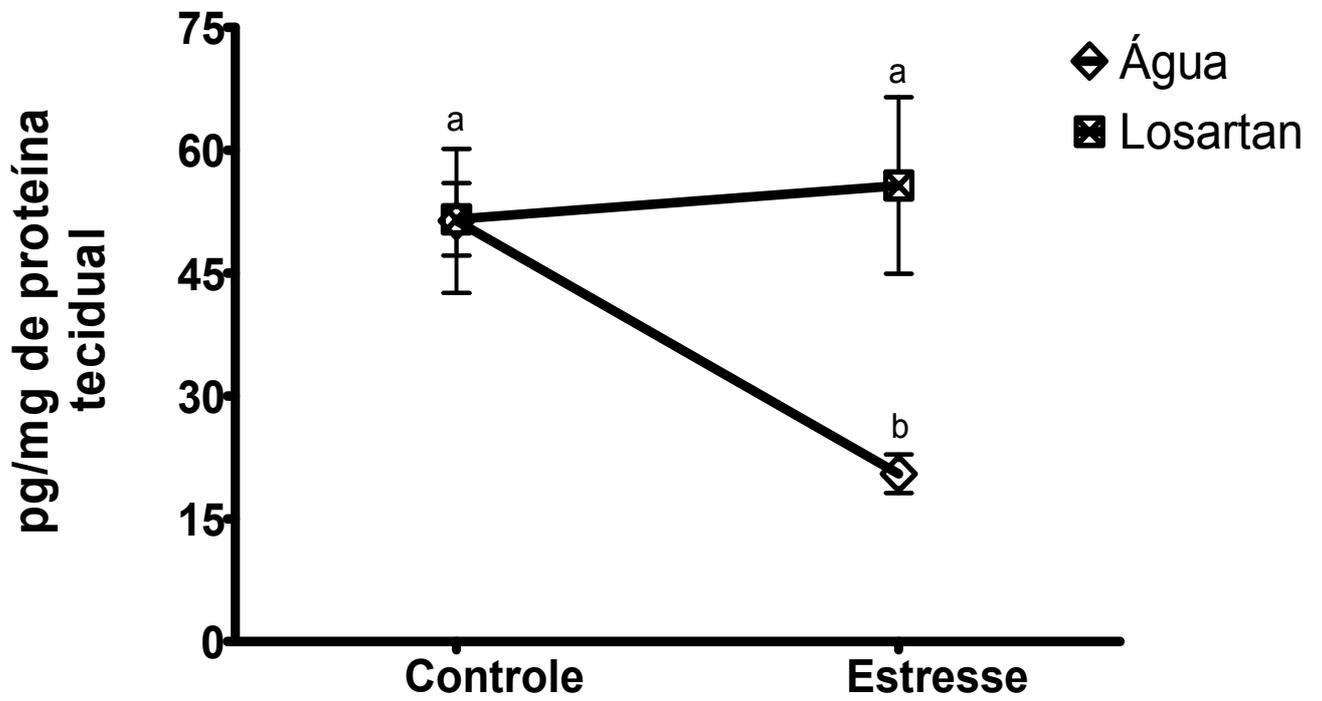


Figura 4: quantificação de IL1- $\beta$  em hipotálamo. Dados analisados por ANOVA de duas vias, expressos como média  $\pm$ EPM.

## IL6 - Hipotálamo

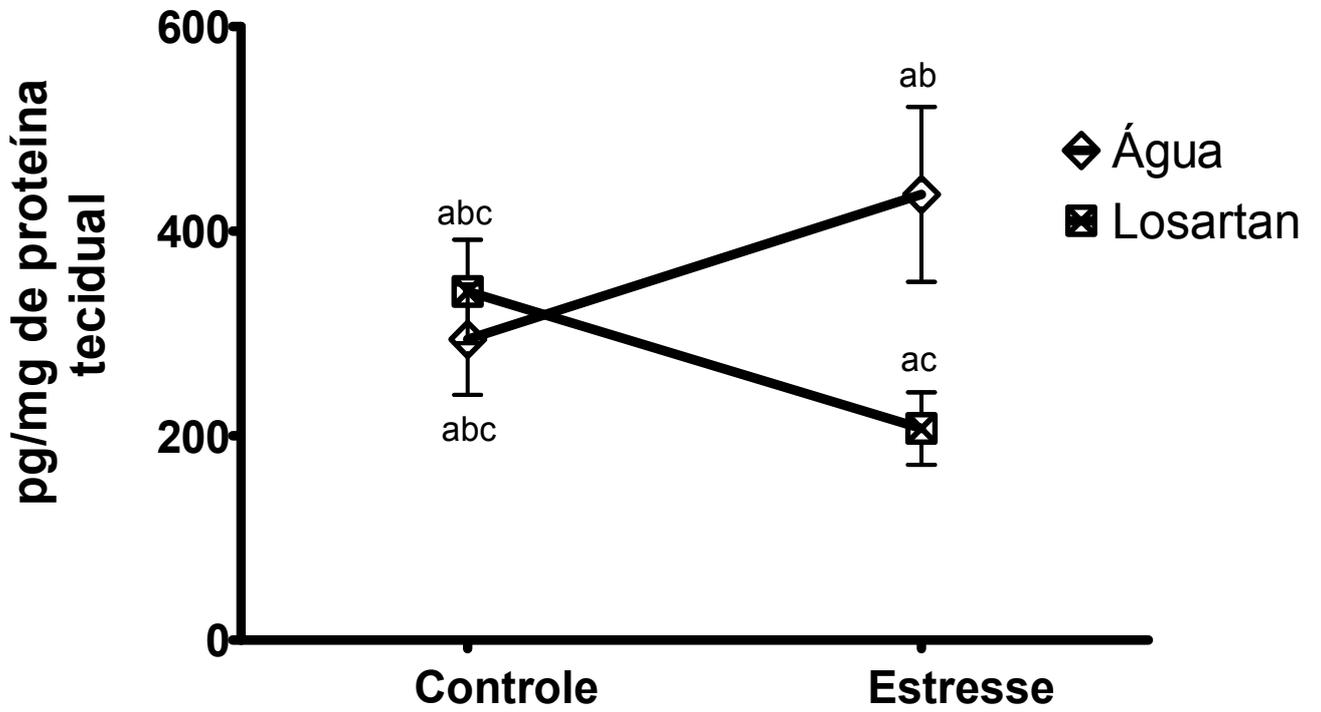


Figura 5: quantificação de IL-6 em hipotálamo. Dados analisados com ANOVA de duas vias, expressos em média  $\pm$  EPM.

## TNF $\alpha$ - Hipotálamo

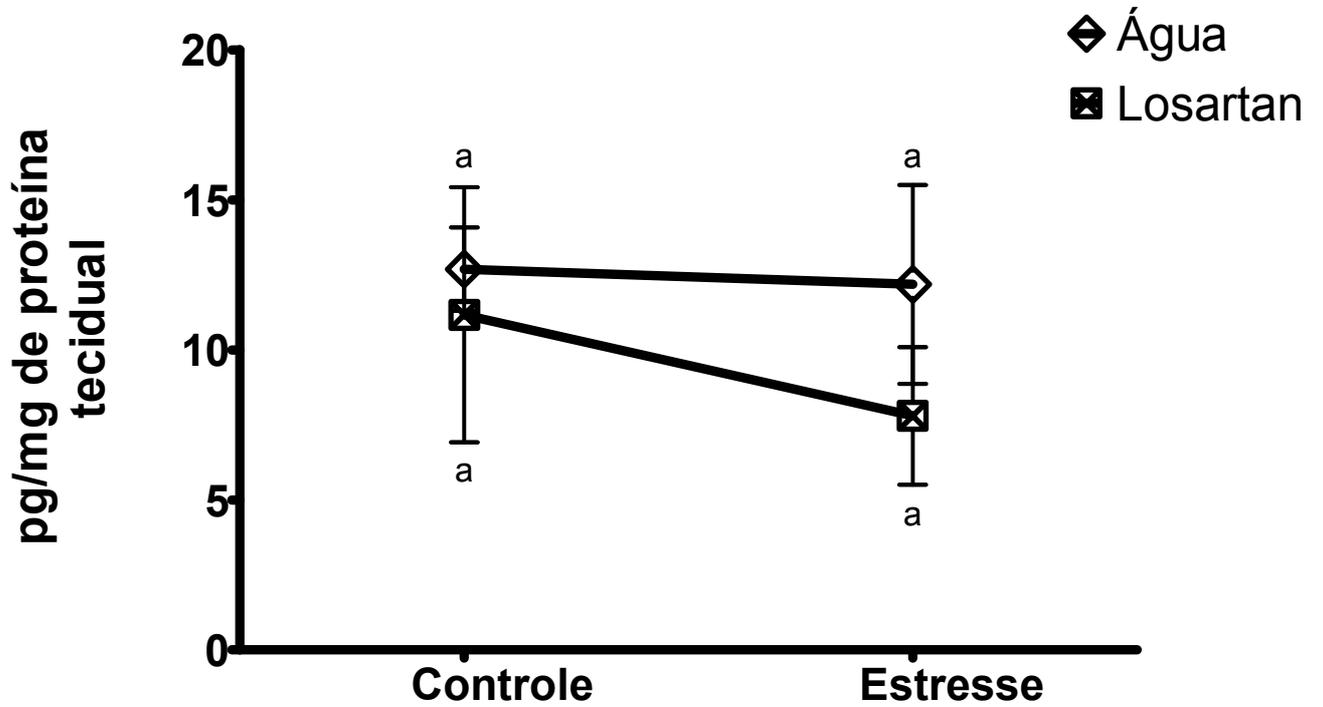


Figura 6: quantificação de TNF- $\alpha$  em hipotálamo. Dados analisados com ANOVA de duas vias, expressos como média  $\pm$  EPM.

#### **4. Conclusões e perspectivas**

Com este trabalho, conclui-se que, a nível de hipocampo em ratos Wistar adultos, há considerável aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$ , no grupo que ingeriu Losartan e não foi submetido à intervenção por estresse. Por outro lado, no hipotálamo, o grupo estressado apresentou diminuição estatisticamente significativa da expressão da citocina IL-1 $\beta$ . Diminuição que foi evitada com a administração da droga.

Este estudo apresenta apenas análises preliminares que podem vir a corroborar para o esclarecimento de mecanismos pelos quais possa ocorrer a modulação do sistema imunológico em eventos de estresse. Muito trabalho ainda tem de ser feito, como a ampliação do número de animais analisados, testes adicionais em diferentes tempos de exposição a estresse e diferentes tempos de duração da intervenção, tanto bioquímicos quanto comportamentais. Assim, teremos um embasamento mais expressivo para verificar qual o real potencial de modulação dos mediadores inflamatórios, dos bloqueadores AT1 para angiotensina II.

## 5. Referências Bibliográficas

1-Van de Kar, L.D., Blair, M.L., 1999. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 20, 1 – 48.

2-Habib, K.E., Gold, P.W., Chrousos, G.P., 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*. 30, 695– 728.

3-Chrousos, G. P. Organization and integration of the endocrine system. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* , ed. M Sperling, pp. 1-14. Philadelphia: Saunders, 2002.

4-Chrousos, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptative response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851:311-35, 1998.

5- Aguilera, G., Rabadan-Diehl, C., Nikodemova, M., 2001. Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides* 22, 769– 774.

6- McIntosh LJ, Sapolsky RM. Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity.. *Neurotoxicology*. 1996 Fall-Winter;17(3-4):873-82.

Review

7-Chrousos, G. P.; D, M.; P, F. A. A.; P, M. A. C.; E, M. A. C. Organization and Integration of the Endocrine System. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 2(2):125-145, 2007.

8- Levens, N.R., 1990. Control of renal function by intrarenal angiotensin II in the dog. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 16 (Suppl. 4), S65–S69.

- 9- Dunn, A.J., Berridge, C.W., 1990. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Research Reviews* 15, 71–100.
- 10- de Souza, E.B., 1995. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20, 789– 819.
- 11- Stout, S.C., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2002. Regulation of corticotropin-releasing factor neuronal systems and hypothalamic– pituitary– adrenal axis activity by stress and chronic antidepressant treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 300, 1085–1092.
- 12- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J., 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394–1397
- 13-Castrén, E. & Saavedra, J.M.Repeated stress increases the density of Angiotensin II binding sites in the rat paraventricular nucleus and subfornical organ. *Endocrinology* 122(1): 370-2, 1988.
- 14- Sumitomo T, Suda T, Nakano Y, Tozawa F, Yamada M, Demura H Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 1991 May;128(5):2248-52

- 15- Plotsky PM, Kjaer A, Sutton SW, Sawchenko PE, Vale W. Central activin administration modulates corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology*. 1991 May;128(5):2520-5
- 16- Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *Journal of Neuroendocrinology* 2008 Jun;20(6):880-4. Review
- 17-Principles of Psychoneuroendocrinology *Psychiatric Clinics of North America*, Volume 21, Issue 2, Pages 259-276 S Campeau, H Day, D Helmreich, S Kollack-Walker, S Watson.
- 18-McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annual Review of Neuroscience*. 1999;22:105-22. Review
- 19-Braun-Menendez, E.; Fasciolo, J. C.; Leloir, L. F.; Munoz, J. M. The substance causing renal hypertension. *Journal of Physiology*. (Lond) 98:283-98, 1940.
- 20- Page I.H., Dustan H.P., Poutasse E.F. Mechanisms, diagnosis and treatment of hypertension of renal vascular origin. *Annals of Internal Medicine*. 1959 Aug;51:196-211
- 21-Ferrario CM. 2006. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*.7(1):3–14.
- 22-Saavedra, J.M., 1992. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine Reviews*.13, 329—380

23-Yang, G.; Wan, Y.; Zhu, Y. Angiotensin II - An Important Stress Hormone. *Neurosignals* 5:1-8, 1996.

24-Saavedra, J. M.; Ando, H.; Armando, I.; Baiardi, G.; Bregonzo, C.; Juorio, A.; Macova, M. Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regulatory Peptides*.128: 227-238, 2005.

25-Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egidio J. 2003. Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.35(6):881–900.

26-Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egidio J. 2002. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney International Supplement*. 82:S12–S22.

27-Li Lua, Mark T. Quinnb, Yao Sun. 2004. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.325(3):943–951.

28- Guo F, Chen XL, Wang F, Liang X, Sun YX, Wang YJ.J. Role of angiotensin II type 1 receptor in angiotensin II-induced cytokine production in macrophages. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2011 Apr;31(4):351-61.

- 29- Goncharova LB, Tarakanov AO. Molecular networks of brain and immunity. *Brain Research Reviews*. 2007 Aug;55(1):155-66. Epub 2007 Feb 22. Review
- 30- Wrona D. J Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *Journal of Neuroimmunology*. 2006 Mar;172(1-2):38-58. Epub 2006 Jan 10. Review
- 31- Cunningham ET Jr, Wada E, Carter DB, Tracey DE, Battey JF, De Souza EB In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *Journal of Neuroscience*. 1992 Mar;12(3):1101-14.
- 32- Otero GC, Merrill JE. Cytokine receptors on glial cells. *Glia*. 1994 Jun;11(2):117-28. Review
- 33- Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *Journal of Neuroimmunology*. 1997 May;75(1-2):104-12
- 34- Licinio J, Wong ML. The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress-responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection. *Molecular Psychiatry*. 1999 Jul;4(4):317-27. Review

- 35- Brebner K, Hayley S, Zacharko R, Merali Z, Anisman H. Synergistic effects of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha: central monoamine, corticosterone, and behavioral variations. *Neuropsychopharmacology*. 2000 Jun;22(6):566-80
- 36- Sims, J.E. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.1993; 90, 6155–6159
- 37-Friedman, J.M. and Halaas, J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395, 763–770
- 38-Kishimoto, T. IL-6: from laboratory to bedside.*Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2005 ; 28: 177-186.
- 39- Brüünsgaard H, Pedersen BK .Age-related inflammatory cytokines and disease..*Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2003 Feb;23(1):15-39
- 40- Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Research*.2005 Jan;15(1):24-7. Review.
- 41- Dinarello CA. Interleukin-1 and tumor necrosis factor: effector cytokines in autoimmune diseases. *Seminars in Immunology*. 1992 Jun;4(3):133-45. Review