

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**ESTUDO DOS MECANISMOS DE RESOLUÇÃO INFLAMATÓRIA EM ANIMAIS
TRATADOS COM ANGIOTENSINA-(1-7) EM MODELOS MURINOS DE ARTRITE**

Lívia Corrêa Barroso

Belo Horizonte

2013

LÍVIA CORRÊA BARROSO

**ESTUDO DOS MECANISMOS DE RESOLUÇÃO INFLAMATÓRIA EM ANIMAIS
TRATADOS COM ANGIOTENSINA-(1-7) EM MODELOS MURINOS DE ARTRITE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário à conclusão do mestrado em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.

Co-orientadora: Prof. Dr. Danielle da Glória de Souza.

Belo Horizonte

2013

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.”

(John F. Kennedy).

Dedico esse trabalho a minha família!

Aos meus pais, os meus maiores exemplos.

A minha irmã, Milena.

Ao Léo, Vitor e Tales.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui:

Ao meu orientador, Mauro Martins Teixeira, pela confiança depositada em mim, por todas as discussões científicas tão esclarecedoras e por toda sua competência que me fez aprender muito ao longo desses seis anos.

A minha co-orientadora, Danielle da Glória de Souza (Dani), por me acolher de forma tão maternal, muito obrigada por todo seu carinho e atenção. Sua presença diária me transmitiu confiança e muito esclarecimento.

A Kátia por me abrir as portas do laboratório de Imunofarmacologia, por me ensinar varias técnicas com muita dedicação e carinho, fazendo com que eu me encantasse pelo fascinante mundo da ciência.

A professora Vanessa Pinho da Silva, pelas idéias e discussões ao longo desse trabalho, obrigada por toda sua disponibilidade, atenção e competência. Seu enorme conhecimento sobre resolução inflamatória foi imprescindível para a realização desse estudo.

Ao professor Robson Augusto Souza dos Santos pela colaboração e por ceder a Angiotensina-(1-7) e os animais *knockout* para o receptor MAS, indispensáveis para a realização desse trabalho. Ao professor Anderson José Ferreira, pela sua colaboração e por me ceder o Dize, ativador endógeno de ECA2. Ao professor Flavio Amaral pelo auxilio durante os experimentos e discussões.

A minha colega Livia Tavares por me ensinar as técnicas utilizadas nesse trabalho, discutir e trabalhar ao meu lado na bancada, esse trabalho também é seu. Ao Fernando Lopes, pela ajuda indispensável nos experimentos de cultura celular. Ao Daniel pelo PCR.

Aos meus colegas e amigos, companheiros de almoços e “happy hours”, Angélica, Daniel, Tiça, Cris, Norine, Ciça e Bárbara.

Aos colegas do grande grupo de imunofarmacologia: Luciana, Remo, Gabriel, Bráulio, Aninha, Camila, Bruno, Juliana, Flávia, Elvis, Larissa, Rafael (Elisão), Caio, Celso, Luana, Vivian, Livia Rezende, Cristiano, Débora, Lucas, Raquel, Renata, Izabela, Ana Carolina, Fátima, Lizia, Denise, Marina, Barbara Maximinio, Priscila e Alesandra.

Aos amigos de outros laboratórios por fazerem tudo mais divertido; Waldeionê, Louisa, Matheus e minha querida amiga Grazi, obrigada pelos conselhos, conversas e compras.

A Ilma e Frank pelo auxílio técnico, que facilitam muito nosso trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, pela oportunidade.

A Deus, por razões que dispensam explicações.

A minha família: Altino, Irene, Milena, Leonardo, Vitor e Tales, parte fundamental nesse processo, obrigada pelo apoio, carinho, respeito, confiança, conselhos e por todo amor. Aos meus pais pelo apoio emocional e financeiro, sei que muitas vezes vocês abriram mão de seus sonhos em função dos meus. A minha irmã Milena por me apoiar em todas minhas decisões, me aconselhar e sempre me fazer buscar o caminho certo. Ao Léo, meu cunhado maravilhoso, por toda paciência e amizade. Ao Vitor, meu afilhado/sobrinho querido, bálsamo para meus dias de cansaço e desânimo, seu sorriso me revigora. Ao Tales, o mais novo membro da família. A Ana Flávia (amiga e família) por me incentivar e apoiar sempre.

RESUMO

Durante as respostas inflamatórias, os leucócitos produzem e secretam mediadores responsáveis pelo início e manutenção da inflamação. A inflamação que em muitos casos é benéfica e protege o organismo contra agentes nocivos, quando descontrolada pode levar a lesão tecidual. Dessa forma muito se tem estudado sobre os mecanismos que controlam e solucionam a resposta inflamatória, assim como mediadores e células envolvidos nesse processo. Recentemente observou-se que a Angiotensina-(1-7), um metabolito do sistema Renina-Angiotensina, considerado por muito tempo como inativo, apresenta importantes ações no controle da resposta inflamatória. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a produção endógena ou administração exógena da Ang-(1-7) pode acelerar a resolução da resposta inflamatória em modelos de artrite em camundongos.

Nesse estudo, todos os tratamentos foram realizados 12 horas após a injeção do antígeno, para diferenciar os efeitos pró-resolutivos e anti-inflamatórios. A administração intra-articular de Ang-(1-7), foi capaz de diminuir o número de neutrófilos no lavado sinovial e no tecido periarticular, assim como aumentar o número de neutrófilos apoptóticos, e inibir NF- κ B na membrana sinovial. Utilizando o tratamento com o DIZE, ativador de ECA2, que induz a formação de Ang-(1-7), os efeitos observados foram semelhantes aos observados com a Ang-(1-7). Esses processos foram revertidos pelo uso do inibidor de caspases, Zvad-FMK, indicando que a ação da Ang-(1-7) seria por indução de apoptose de neutrófilos. A Ang-(1-7) também foi capaz de induzir apoptose diretamente em neutrófilos humanos *in vitro*, esse efeito foi associado com a inibição da ativação de NF- κ B nos neutrófilos.

Dessa forma, concluímos que a Ang-(1-7) possa representar uma estratégia pró-resolutiva eficaz para o tratamento das doenças nas quais, o acúmulo e presença de neutrófilos possa representar danos.

Palavras chave: Sistema Renina- Angiotensina, Angiotensina-(1-7), DIZE (ativador de ECA2), resolução da resposta inflamatória, apoptose, artrite.

ABSTRACT

During inflammatory responses, leukocytes, produce and secrete mediators responsible for the initiation and maintenance of inflammation. Inflammation may be beneficial and protects the body against harmful agents. However, when uncontrolled, it can lead to tissue damage. Thus, there is much interest in understanding mechanisms that control and resolve the inflammatory response, as well as mediators and cells involved in this process. Recently, it was observed that Angiotensin-(1-7), a metabolite of Renin-Angiotensin system may control the inflammatory response. Therefore, the objective of this study was to evaluate whether endogenous production or exogenous administration of Ang-(1-7) could control the resolution of the inflammatory response in models of arthritis in mice.

In this study, all treatments were given 12 hours after the injection of antigen in order to separate anti-inflammatory from pro-resolutive effects. The intra-articular administration of Ang-(1-7) decreased the number of neutrophils in the synovial cavity and in periarticular tissues, increased the number of apoptotic cells and inhibited translocation of Nf- κ B in a model of antigen-induced arthritis in mice. Treatment with DIZE, an activator of ACE2 which induces generation of Ang-(1-7), induced effects which were similar to those observed with the administration of Ang-(1-7). Resolution of inflammation was reversed by use of the inhibitor of caspases Zvad-FMK, indicating that the action of Ang-(1-7) was inducing apoptosis of neutrophils. Indeed, Ang-(1-7) was also able to directly induce apoptosis of human neutrophils *in vitro*. The latter effect was associated with inhibition of the activation of NF- κ B in neutrophils.

Therefore, we conclude that Ang-(1-7) has pro-resolutive effects on inflammation and may be useful for the treatment of diseases in which the accumulation of neutrophils may have a pathophysiological role.

Keywords: renin-angiotensin system, angiotensin-(1-7), dize (ace2 activator), resolution of the inflammatory response, apoptosis, arthritis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Artrite Induzida por antígeno
ANOVA	Análise de variância
Ang	Angiotensina
AR	Artrite reumatóide
AT1	Receptor Angiotensinérgico do Tipo 1
AT2	Receptor Angiotensinérgico do Tipo 2
BSA	Albumina de soro bovina
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CC	Controle
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano tecidual
DIZE	Aceturato de Diminazeno, Ativador de ECA2
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
ELISA	Ensaio Imunoenzimático

HE Hematoxilina e Eosina

ICAM-1,2 e 3 Moléculas de adesão intercelular

ICB Instituto de Ciências Biológicas

i.p. Intraperitoneal

LPS Lipopolissacarídeo

Mas Receptor da Angiotensina-(1-7) acoplado à proteína G

Mas^{-/-} Camundongos com deleção genética do receptor Mas

Mas^{+/+} Camundongos com presença do receptor Mas, tipo selvagem

mBSA Albumina de soro bovino metilada

MPO Mieloperoxidase

NaCl Cloreto de Sódio

NF- κ B Fator de Transcrição Nuclear kapa B

PAMPs Padrões moleculares associados à patógenos

PBS Tampão Fosfato Salino

PECAM-1 Moléculas de adesão celular plaqueta-endotelio

PMN Leucócitos polimorfonucleares

SRA Sistema Renina Angiotensina

TMB Tetrametilbenzidina

TNF- α Fator de Necrose Tumoral alfa

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM-1 Moléculas de adesão celular vascular

ZVAD-FMK Inibidor de caspases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Recrutamento leucocitário. Rolamento, adesão e transmigração leucocitária.....	18
Figura 2 Sistema Renina-Angiotensina. Principais peptídeos biologicamente ativos no SRA e principais ações da Angiotensina II e Angiotensina-(1-7)..	24
Figura 3 Desenho experimental do modelo de artrite reumatóide induzida por antígeno (AIA).	31
Figura 4 Desenho experimental do modelo de artrite reumatóide induzida por LPS.	32
Figura 5 Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo..	36
Figura 6 Foto no momento do teste de pressão crescente na pata de camundongo..	37
Figura 7 Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7), na resolução inflamatória em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)..	43
Figura 8 Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7) na hipernocicepção, em um modelo de artrite induzida por antígeno..	44
Figura 9 Efeito da administração local de DIZE (ativador endógeno de ECA2) na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA).....	46
Figura 10 Efeito da Angiotensina-(1-7), do ativador de ECA2, DIZE, nos níveis de NF- κ B..	47
Figura 11 Efeito da Angiotensina-(1-7) em cultura de neutrófilos humanos do sangue periférico.....	48
Figura 12 Presença do receptor MAS em neutrófilos do sangue periférico humano.....	49
Figura 13 Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7) em um modelo de artrite induzida por LPS..	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Artrite: Aspectos Gerais.....	13
1.2 Inflamação	14
1.2.1 Inflamação aguda	15
1.2.2 Inflamação crônica.....	16
1.2.3 Recrutamento de leucócitos.....	16
1.2.4 Papel dos neutrófilos	18
1.2.5 Apoptose.....	19
1.2.6 Resolução da resposta inflamatória.....	20
1.3 Sistema Renina Angiotensina, Aspectos Gerais	22
1.3.1 Angiotensina-(1-7)	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3. METODOLOGIA.....	28
3.1. Utilização de Camundongos e Aprovação do Comitê de Ética	28
3.2. Fármacos e Reagentes	28
3.3. Preparação das Drogas	28
3.4 Modelos Murinos de Artrite Imuno-Induzida	29
3.4.1 Modelo de artrite inflamatória induzida por antígeno (AIA)	29
3.4.2 Modelo de artrite induzida por LPS	29
3.5 Protocolo de Tratamento dos Grupos Experimentais.....	30
3.5.1 Modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos (AIA).....	30
3.5.1.1 Tecidos e fluidos coletados	30
3.5.1.2 Parâmetros avaliados:	31
3.5.2 Modelo de artrite induzida por LPS.....	31
3.5.2.1 Tecidos e fluidos coletados	32
3.5.2.2 Parâmetros avaliados:	32
3.6 Parâmetros Avaliados	33
3.6.1 Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular	33
3.6.2 Contagem total dos leucócitos	33
3.6.3 Contagem diferencial dos leucócitos	33

3.6.4 Avaliação da apoptose de leucócitos	34
3.6.5 Quantificação indireta de neutrófilos: atividade da mieloperoxidase (MPO)	34
3.6.5.1 Processamento tecidual:	34
3.6.5.2 Ensaio bioquímico:	35
3.6.6 Avaliação de hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata de camundongo	35
3.6.7 Avaliação por Western Blot.....	37
3.6.8 Protocolo de extração de neutrófilos de sangue periférico humano e cultura celular.	38
3.6.9 RT-PCR – Reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa.....	39
3.6.9.1 Extração do RNA	39
3.6.9.2 Quantificação do RNA	40
3.6.9.3 Preparo do cDNA por Transcrição Reversa	40
3.6.9.4 PCR específica.....	41
3.7 Análise Estatística.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Efeitos Pró-Resolutivos da Angiotensina-(1-7) em Camundongos com Artrite Induzida por Antígeno (AIA)	42
4.2 Efeito do Ativador Endógeno de Eca2, Dize, em Camundongos com Artrite Induzida por Antígeno (AIA).....	44
4.3 Efeito da Angiotensina-(1-7) e do Ativador de Eca2, Dize, nos Níveis de NF-KB.	46
4.4 Ação da Angiotensina-(1-7) em Neutrófilos Humanos.....	47
4.5 Presença do Receptor MAS em Neutrófilo Humano do Sangue Periférico	48
4.6 Ação da ANG-(1-7) no Modelo de Artrite Induzida por LPS	49
5. DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES.....	56
7 REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite: Aspectos Gerais

Denomina-se genericamente artrite qualquer processo inflamatório que afete a articulação e essa denominação é utilizada para se referir a um grupo de mais de 100 doenças reumáticas que podem causar dor, enrijecimento e edema das articulações. A artrite reumatoide (AR) é a mais comum das artrites inflamatórias e a que causa maior incapacidade, afetando aproximadamente 1% da população adulta do mundo, acometendo com maior frequência mulheres. Está diretamente relacionada à dor e perda de função que são as principais causas de morbidade e fatores limitantes para o trabalho e execução das atividades de vida diária (ALAMANOS; DROSOS, 2005; MINAUR *et al.*, 2004). A doença também está associada a uma taxa de mortalidade considerável, principalmente em decorrência de eventos cardiovasculares (GONZALEZ-GAY; GONZALEZ-JUANATEY; MARTIN, 2005; SNOW; MIKULS, 2005).

A AR é uma doença poliarticular que afeta principalmente as pequenas articulações das mãos e pés (FIRESTEIN, 2003). Células inflamatórias são recrutadas para a articulação e, quando ativadas, contribuem para a destruição articular local. Neutrófilos em particular, fundamentais no desencadeamento e manutenção do processo inflamatório das articulações, acumulam-se no fluido sinovial e liberam enzimas proteolíticas que causam tal destruição (JASIN, 2000; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 1994; MCINNES; SCHETT, 2007; NEUMANN *et al.*, 2002; SHIOZAWA; SHIOZAWA; FUJITA, 1983).

Clinicamente a AR é considerada uma doença inflamatória crônica, é observada a inflamação da membrana sinovial com formação de *pannus* (crescimento exacerbado do tecido conjuntivo sobre a superfície articular), com invasão e destruição das estruturas articulares e osso (HALE; MORIARTY, 2001). A cavidade sinovial que, em condições normais, se apresenta como uma estrutura acelular delimitada por uma fina membrana conjuntiva, torna-se espessa em decorrência do aumento dos sinoviócitos. Esta região intersticial passa a ser preenchida por infiltrado celular, contendo: fibroblastos sinoviais, macrófagos, mastócitos, células T CD4⁺, CD8⁺, natural killer (NK), células B e células plasmáticas. O infiltrado sinovial invade a cartilagem adjacente e promove destruição

articular, que é mediada por osteoclastos ativados, condrócitos e fibroblastos sinoviais (GRAVALLESE *et al.*, 2000).

Apesar de inúmeros estudos, a patogênese da AR ainda permanece obscura. Trata-se de uma doença complexa e multifatorial da qual fazem parte auto-imunidade, inflamação crônica, destruição articular, fatores ambientais e genéticos. Associado à auto-imunidade, observa-se a produção de anticorpos específicos para imunoglobulinas G (IgG), conhecidos como “*fatores reumatóides*” e alguns peptídeos contendo citrulina (Firestein, 2003). Além disso, é expressiva a participação de linfócitos (Th1 e Th17) com sua grande produção de citocinas e quimiocinas (ESENSTEN; WOFSY; BLUESTONE, 2009; LUBBERTS; KOENDERS; VAN DEN BERG, 2005; SCHULZE-KOOPS; KALDEN, 2001). Os linfócitos B produzem autoanticorpos, com conseqüente formação de complexos imunes (TAKEMURA *et al.*, 2001). Várias citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL-1 β , IL-10 e IL-18) também estão envolvidas no processo inflamatório e na lesão articular característicos da AR (BRENNAN; MCINNES, 2008; MCINNES; SCHETT, 2007). Além dos fatores genéticos e imuno-inflamatórios, fatores ambientais também contribuem para a indução, intensidade e progressão da doença, como, por exemplo, o hábito de fumar, que promove a adição do aminoácido citrulina a proteínas do organismo, tornando-as antigênicas (KLARESKOG; PADYUKOV; ALFREDSSON, 2007).

1.2 Inflamação

A resposta inflamatória pode ser caracterizada como um processo fisiológico, pelo qual os tecidos do corpo respondem a diferentes estímulos, sejam eles causados por agentes infecciosos, trauma, cirurgia, queimadura, infarto do tecido, câncer, entre outros. (DINARELLO, 1997; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Modificações na microcirculação, tais como os fenômenos angiogênicos, migração de leucócitos através do leito vascular e liberação de moléculas solúveis nos tecidos danificados são as principais características da inflamação, que é uma reação secundária em resposta às lesões a fim de que a homeostase tecidual seja restaurada (NATHAN, 2002). A inflamação elimina o agente nocivo e desencadeia eventos que podem curar e reconstruir o tecido lesado. O reparo tecidual começa nas fases iniciais da inflamação, mas só finda quando a influência nociva for

neutralizada (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Entretanto a mesma resposta inflamatória que protege o organismo de agentes nocivos, pode se tornar prejudicial. A inflamação é, por exemplo, a base de várias doenças crônicas como aterosclerose, asma, esclerose múltipla, fibrose pulmonar e também da artrite reumatóide (COMINI-FROTA *et al.*, 2012; DA SILVEIRA *et al.*, 2010a; NATHAN; DING, 2010; RUSSO *et al.*, 2011).

Embora o processo inflamatório seja conhecido pela humanidade há milhares de anos, o primeiro a definir seus sintomas clínicos foi o médico romano Cornelius Celsus. Os sintomas descritos por ele são conhecidos hoje como os sinais cardinais da inflamação e são eles: o *rubor* (vermelhidão, devido ao aumento da quantidade de sangue no local da inflamação (hiperemia)), *tumor* (edema causado pelo aumento da permeabilidade vascular), *calor* (aumento da temperatura no local da inflamação, associado com o aumento do fluxo sanguíneo) e *dolor* (dor, em parte devido à sensibilização das terminações nervosas causadas por mediadores inflamatórios). Mais tarde, em 1858, foi descrito por Rudolph Virchow o quinto sinal cardinal, *functio laesa* (perda de função, disfunção dos órgãos e tecidos envolvidos), esse sinal é considerado um sinal universal da inflamação, porque acompanha todos os processos inflamatórios, já os quatro sinais descritos por Celsus, se aplicam à inflamação aguda que acompanha feridas e infecções (MEDZHITOV, 2010).

Outro marco importante foi à descoberta da fagocitose em 1892 por Elie Metchnikoff que desenvolveu a teoria da imunidade celular. Sua teoria enfatizou os benefícios da inflamação e mostrou o papel de macrófagos e micrófagos (neutrófilos) na defesa do hospedeiro e na manutenção da homeostase tecidual (TAUBER, 2003). Essas descobertas contribuíram para uma nova visão do processo inflamatório baseada em eventos celulares, gerando um grande interesse nos mecanismos envolvidos nesse processo fisiológico.

1.2.1 Inflamação aguda

A inflamação aguda é a resposta primária a um estímulo. Consiste no recrutamento e ativação de leucócitos e no extravazamento de várias proteínas plasmáticas para o local da infecção ou trauma, a fim de eliminar o agente infeccioso (Abbas, 2008). Na inflamação aguda, há um predomínio de células polimorfonucleares, neutrófilos, que são as primeiras células recrutadas para o local da inflamação (NATHAN, 2002). No decorrer da inflamação ocorre uma mudança do perfil celular: há uma diminuição no número de neutrófilos e um

aumento no recrutamento de monócitos, os quais se diferenciam localmente em macrófagos, que irão iniciar o processo de resolução inflamatória juntamente com outros mediadores (NORLING; SERHAN, 2010).

1.2.2 Inflamação crônica

A inflamação pode ser benéfica quando bem controlada. No entanto, em excesso, pode-se tornar prejudicial devido a sua potente ação de destruição tecidual, progredindo para a inflamação crônica, cicatrização e fibrose (MEDZHITOV, 2010). Na maioria dos casos, esse dano tecidual é causado pela acúmulo excessivo de leucócitos (NORLING; SERHAN, 2010). Na inflamação crônica ocorre um predomínio da resposta imune adaptativa, com maior presença de monócitos e linfócitos (SERHAN *et al.*, 2007). A inflamação crônica é caracterizada por uma resposta de duração prolongada, podendo originar-se a partir de infecções persistentes, exposição prolongada a agentes tóxicos e auto-imunidade (Robbins,1994).

1.2.3 Recrutamento de leucócitos

O recrutamento de leucócitos é indispensável à imunidade inata de defesa do hospedeiro (GENG, 2001), no entanto esse processo ocorre também em condições normais, como por exemplo, no tráfego de linfócitos para tecidos linfoides e outros tecidos (GILROY *et al.*, 2004). Na resposta inflamatória, a migração leucocitária é regulada pela ação de mediadores pró e anti-inflamatórios que promovem e controlam o extravasamento dessas células, evitando assim uma resposta inflamatória descontrolada.

Durante o processo inflamatório, as reações vasculares e celulares são mediadas por fatores quimiotáticos derivados de proteínas ou células plasmáticas que são produzidas ou ativadas pelo estímulo inflamatório. Tais processos resultam na quimiotaxia dos leucócitos e permitem a interação de células circulantes com as células endoteliais, possibilitando assim a transmigração dos leucócitos para o sítio inflamatório (GILROY *et al.*, 2004). Desse modo, o processo de recrutamento dos leucócitos para o sítio inflamatório obedece aos seguintes passos: captura, rolamento, adesão firme ao endotélio e transmigração endotelial (Figura 1).

Após um estímulo inflamatório inicial, ocorre vasodilatação e aumento da permeabilidade endotelial, provocando um aumento da pressão hidrostática e diminuição da pressão osmótica do plasma pela saída de líquido rico em proteínas. A perda de líquido resulta em concentração elevada de hemácias e aumento da viscosidade sanguínea, deixando o fluxo mais lento e contribuindo para que os leucócitos se movam para as camadas mais periféricas da corrente sanguínea, iniciando a chamada marginação leucocitária ao longo do endotélio vascular (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010). Mediadores pró-inflamatórios (citocinas, quimiocinas, e mediadores lipídicos) liberados por células residentes (macrófagos, células dendríticas e células epiteliais) no tecido lesado, ativam leucócitos circulantes e induzem mudanças nas propriedades de adesão das células endoteliais (NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005). O contato dos leucócitos sanguíneos com o endotélio vascular do tecido é mediado por moléculas de adesão específicas presentes nos leucócitos e nas células do endotélio, por exemplo, as selectinas (L, P e E) e seus ligantes (proteínas que contêm carboidratos); as integrinas, que se ligam a moléculas da superfamília das imunoglobulinas, como moléculas de adesão intercelular (ICAM-1,2 e 3); moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e moléculas de adesão celular plaqueta-endotélio (PECAM-1) (SIMON; GREEN, 2005). Os agentes quimiotáticos promovem também a ativação de receptores de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, levando ao aumento do número e, principalmente, da afinidade de integrinas expressas na superfície do leucócito, além de ativar inúmeras moléculas pertencentes às vias de tradução de sinal intracelular, que são fundamentais para que a resposta inflamatória ocorra (MARINISSEN; GUTKIND, 2001).

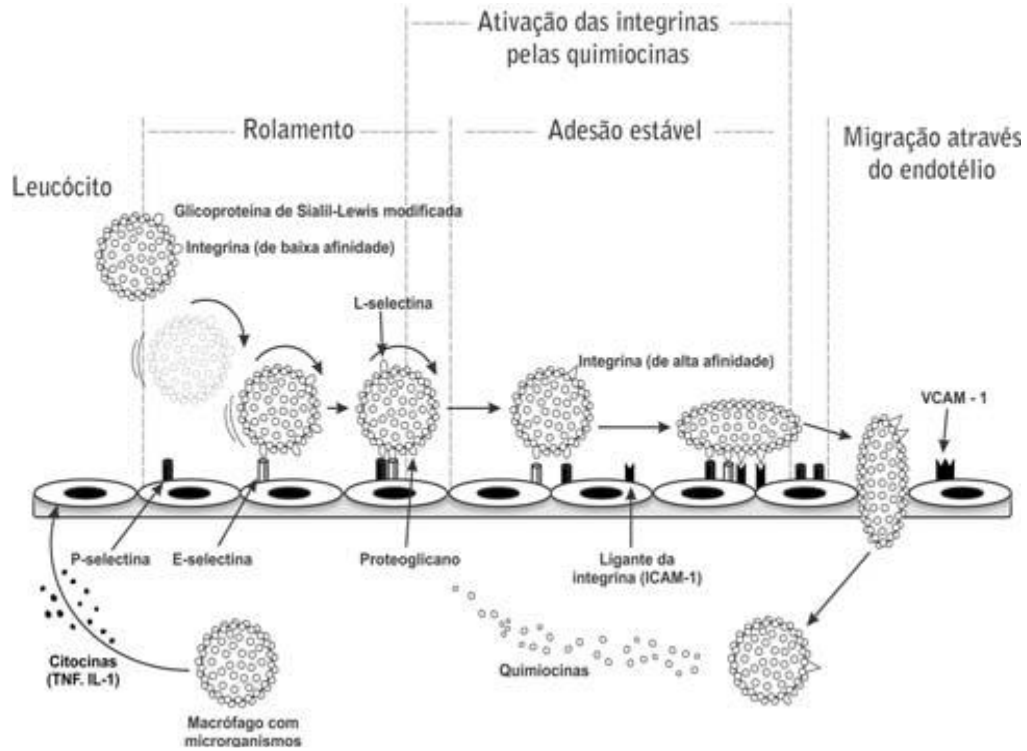


Figura 1 Recrutamento leucocitário. Rolamento, adesão e transmigração leucocitária. FRANCISCHETTI, 2010.

1.2.4 Papel dos neutrófilos

Neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN) são células presentes continuamente na circulação sanguínea e são responsáveis pela defesa inicial contra infecções por micro-organismos (BURG; PILLINGER, 2001). Os neutrófilos agem no reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados ao dano tecidual), através de receptores do tipo *Toll Like* (TLRs), ou outros receptores da resposta imune inata, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular e ativação de genes pró-inflamatórios (PRINCE *et al.*, 2011a). Deste modo, os neutrófilos são componentes centrais na resposta inflamatória e contribuem para inúmeras doenças inflamatórias (WEISS, 1989). Na artrite reumatóide, por exemplo, os neutrófilos migram para o fluido sinovial, onde fagocitam complexos imunes e liberam proteases, sendo as principais células efetoras, capazes de causar danos articulares diretamente à cartilagem e ossos durante a resposta inflamatória induzida pela artrite (CASCAO *et al.*, 2010a). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na articulação de pacientes com AR ativa, e têm um papel importante tanto nas fases iniciais quanto tardias da doença (WIPKE; ALLEN, 2001). Estudos

têm mostrado o envolvimento dos neutrófilos no remodelamento ósseo (CASCAO *et al.*, 2010a; POUBELLE *et al.*, 2007). Além disso, neutrófilos isolados, quando estimulados, têm alto potencial para se diferenciarem e adquirirem características de osteoclastos pelo aumento da expressão de RANK/RANKL (POUBELLE *et al.*, 2007).

Quando ativados por mediadores inflamatórios ou por peptídeos bacterianos, os neutrófilos aumentam a expressão de moléculas de adesão, migram para o tecido em direção ao gradiente quimiotático, aumentam sua capacidade fagocítica e produzem fatores importantes que são efetores da resposta neutrofílica (BURG; PILLINGER, 2001). Uma vez no tecido, os neutrófilos exercem suas funções efetoras mediante liberação de enzimas contidas em seus grânulos, como por exemplo, mieloperoxidase (MPO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), elastases, collagenases, entre outras. Essas enzimas, além de permitirem a erradicação de infecções, por destruírem os patógenos fagocitados, podem causar lesões graves às células adjacentes e tecidos (CASCAO *et al.*, 2010a). Sendo assim, estratégias capazes de interferir no recrutamento de neutrófilos são de grande importância para o controle de diversas doenças inflamatórias. Em modelos de inflamação aguda causado por isquemia e reperfusão, por exemplo, foi demonstrado que estratégias que inibam o recrutamento de neutrófilos são capazes de diminuir as lesões nestes tecidos (BARROSO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2004). Outra estratégia relevante a fim de diminuir os efeitos nocivos dos neutrófilos, é interferir no tempo de presença dessas células no tecido, de modo a antecipar a resolução inflamatória, através da indução da apoptose (LOPES *et al.*, 2011a; VAGO *et al.*, 2012a).

1.2.5 Apoptose

A apoptose, também conhecida como morte celular programada das células, é uma via genética bem conservada evolutivamente. É uma forma de morte celular altamente controlada e essencial para a homeostase tecidual, controle da inflamação e desenvolvimento de organismos multicelulares (SAVILL *et al.*, 2002). Durante a apoptose ocorrem eventos morfológicos e bioquímicos bem específicos como a condensação e fragmentação da cromatina nuclear, compactação das organelas citoplasmáticas, diminuição do volume da célula e alterações na membrana plasmática, o que resulta no reconhecimento e fagocitose dessas células (COHEN, 1997). A célula também sofre um processo chamado *blebbing* (brotamento), com conseqüente formação de corpos apoptóticos (pequenas vesículas que

transportam o conteúdo celular). Os corpos apoptóticos também são reconhecidos, fagocitados e degradados pelas células vizinhas ou fagócitos profissionais (SAVILL; FADOK, 2000). Assim, nenhuma proteína intracelular ou metabólitos são libertados para o tecido circundante, evitando uma resposta inflamatória.

Existem duas vias principais que levam a apoptose, ambas as quais culminam em vias comuns para a morte celular programada, que se caracterizam por ativação de proteases chamadas caspases, as quais atuam clivando estruturas celulares e promovendo a decomposição celular. A via intrínseca (ou mitocondrial), que envolve a liberação de proteínas indutoras de morte que normalmente estão seqüestradas dentro das mitocôndrias, promovendo à liberação de citocromo c, desencadeado por proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2; e a via extrínseca, que é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana na superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral rTNF (conhecidos como receptores de morte) (BEST, 2008; NORLING; SERHAN, 2010). A apoptose de neutrófilos seguida pela remoção por fagócitos é um processo primordial na resolução inflamatória (ROSSI *et al.*, 2007; SERHAN; SAVILL, 2005; SOUSA *et al.*, 2010a). O controle preciso do programa de morte de neutrófilos proporciona um equilíbrio entre suas funções de defesa e sua eliminação segura, enquanto uma deficiência na regulação da morte de neutrófilos contribui com uma ampla gama de patologias inflamatórias (EL *et al.*, 2008; GILROY *et al.*, 2004; JONSSON; ALLEN; PENG, 2005).

1.2.6 Resolução da resposta inflamatória

Resolução da inflamação é um processo complexo e ativamente controlado (BUCKLEY *et al.*, 2013) essencial para manutenção da saúde do hospedeiro, onde mediadores endógenos e células são sincronizados vindo a prevenir uma inflamação excessiva e removendo neutrófilos em apoptose retornando o organismo a homeostase (SERHAN, 2011). Diante de um dano ou agente invasor são liberados mediadores pró-inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas, que desempenham um papel importante a fim de recrutar células de defesa (primeira delas, os neutrófilos) para o local da lesão e eliminar o estímulo lesivo. No entanto, o excesso desses mediadores, assim como a permanência de células inflamatórias no tecido, pode resultar em inúmeras doenças (HANSSON; ROBERTSON; SODERBERG-NAUCLER, 2006; SERHAN; SAVILL, 2005).

A resolução eficiente da inflamação baseia-se na inibição do influxo de neutrófilos, recrutamento não fisiológico de monócitos e depuração rápida de neutrófilos infiltrados, limitando a lesão tecidual e impedindo a progressão da inflamação (SERHAN *et al.*, 2007; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Se o hospedeiro não for capaz de conter o agente agressor ou ocorrerem falhas nos mecanismos pró-resolutivos, a inflamação pode perdurar, gerando diferentes graus de lesão tecidual. De acordo com o grau da lesão ocorrerá a regeneração do tecido, ou caso seja um dano tecidual extenso, como ocorre nas inflamações crônicas, as células lesadas serão substituídas, ocorrendo deposição de colágeno e cicatrização (fibrose), um processo que pode levar à perda da função do órgão (GILROY *et al.*, 2004). A regulação da apoptose é um ponto crucial na resolução inflamatória, sendo controlada por uma rede complexa de vias de sinalização. No entanto, em diferentes contextos, a inibição ou aceleração da apoptose pode ter conseqüências patológicas, como em infecções pelo do vírus influenza e HIV, nas quais a diminuição do tempo de sobrevivência de neutrófilos, devido à aceleração da apoptose, resulta na deficiência das defesas contra micro-organismos e aumenta a susceptibilidade a infecções. Entretanto, em outros tipos de patologias tais como, pneumonia, fibrose cística e artrite reumatóide, o atraso da apoptose está relacionado com o aumento do dano tecidual, correlacionando assim a apoptose de neutrófilos com gravidade e/ou resultado da doença. Dessa forma, a inibição da apoptose de neutrófilos contribui para a inflamação persistente, enquanto que a indução de apoptose em neutrófilos exerce ações anti-inflamatórias e acelera a resolução da inflamação (MILOT; FILEP, 2011a).

Alguns mediadores exercem múltiplas funções, a exemplo a Prostaglandina E₂, que participa no desencadeamento da inflamação e também na fase de resolução (CHAN; MOORE, 2010). Outro exemplo, no contexto celular são os macrófagos, que participam no início da inflamação e também no processo resolutivo. Os monócitos se diferenciam localmente em macrófagos. Os primeiros macrófagos a chegarem ao local da lesão apresentam um perfil pró-inflamatório e são chamados M1. Estes macrófagos apresentam baixa capacidade fagocítica e estão envolvidos com a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Uma vez que consomem células apoptóticas, os macrófagos mudam seu fenótipo para M2, aumentam a sua capacidade fagocítica e produzem moléculas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β . Produzem também mediadores pró-resolutivos que impedem o recrutamento de neutrófilos e promovem o recrutamento de mais monócitos, amplificando a eficiência do

processo de fagocitose. Estes macrófagos estão envolvidos com o reparo e tem um papel importante no retorno da homeostase tecidual. No entanto, também podem promover a formação de cicatrizes e fibrose. Uma vez desempenhado seu papel de remoção de células apoptóticas, os macrófagos M2 mudam novamente seu fenótipo para Mres (macrófago resolutivo). O Mres está envolvido com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, pró-resolutivos e anti-fibróticos, participando ativamente da resolução inflamatória, sendo posteriormente drenado pelos vasos linfáticos (ARIEL; SERHAN, 2012).

Agentes pró resolutivos podem, então, ser distinguidos pela suas habilidades em: contra-regular mediadores que promovam o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, diminuir a dor, estimular o recrutamento não fisiológicos de monócitos, aumentar a taxa de apoptose de neutrófilos e ativar macrófagos a fagocitarem neutrófilos apoptóticos, promovendo a limpeza tecidual e retorno à homeostase (BUCKLEY *et al.*, 2013). Dessa forma a resolução inflamatória é um processo de suma importância a fim de manter o equilíbrio do organismo.

1.3 Sistema Renina Angiotensina, Aspectos Gerais

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) é classicamente conceituado como um sistema humoral que exerce funções cardiovasculares, renais e adrenais (ZAMAN; OPARIL; CALHOUN, 2002). Sua cascata de ativação inclui várias interações enzima-substrato que resultam na produção de vários peptídeos biologicamente ativos (ARDAILLOU, 1999; FERRARIO *et al.*, 1998; NISHIMURA, 2001). A Angiotensina II (Ang II) é o principal peptídeo biologicamente ativo do SRA. A renina, uma protease liberada pelo aparelho justa glomerular, é responsável por clivar o angiotensinogênio produzido no fígado, em Angiotensina I, que por sua vez, é clivada pela enzima conversora de Angiotensina (ECA) em Angiotensina II (METHOT *et al.*, 1997) (Figura 2). Ang II exerce grande parte de seus efeitos biológicos através da ativação do receptor AT1. Dentre os efeitos destacam-se: vasoconstrição, hipertrofia celular, fibrose, formação de radicais de superóxido, ativação do sistema nervoso simpático, secreção de endotelina e aldosterona (CAREY; SIRAGY, 2003a). A Ang II também pode se ligar ao receptor AT2 produzindo efeitos opostos aos mediados pelo receptor AT1 (FERRARIO; TRASK; JESSUP, 2005; SANTOS *et al.*, 2008).

As ações do SRA eram atribuídas exclusivamente a Angiotensina II. No entanto, sobretudo na última década, a descoberta de efeitos biológicos de outros peptídeos angiotensinogênicos, novos receptores, novas enzimas, rotas metabólicas e vias de sinalização modificaram a visão sobre esse sistema (PINHEIRO *et al.*, 2009; SANTOS; FERREIRA; SIMOES E SILVA AC, 2008). Outro peptídeo biologicamente ativo que exerce efeitos opostos aos mediados pela ativação do receptor AT1 pela Ang II, é a Angiotensina-(1-7). Este peptídeo foi considerado por muito tempo como um metabólito inativo (GREENE *et al.*, 1982), mas esse conceito começou a mudar com estudos de SCHIAVONE *et al.* (1988) sobre o papel da Ang-(1-7) em estimular a liberação de vasopressina pelo hipotálamo. Desde então, inúmeros estudos tem contribuído para modificar a visão sobre SRA e de suas funções (CHAPPELL, 2007; FERREIRA; SANTOS, 2005; SANTOS; FERREIRA; SIMOES E SILVA AC, 2008; SIMOES E SILVA AC *et al.*, 2006). Esse peptídeo exerce as suas funções, principalmente, através da ativação do receptor de sete domínios transmembrânicos acoplados a proteína G, denominado receptor Mas (receptor AT 1-7) (SIMOES E SILVA AC *et al.*, 2004).

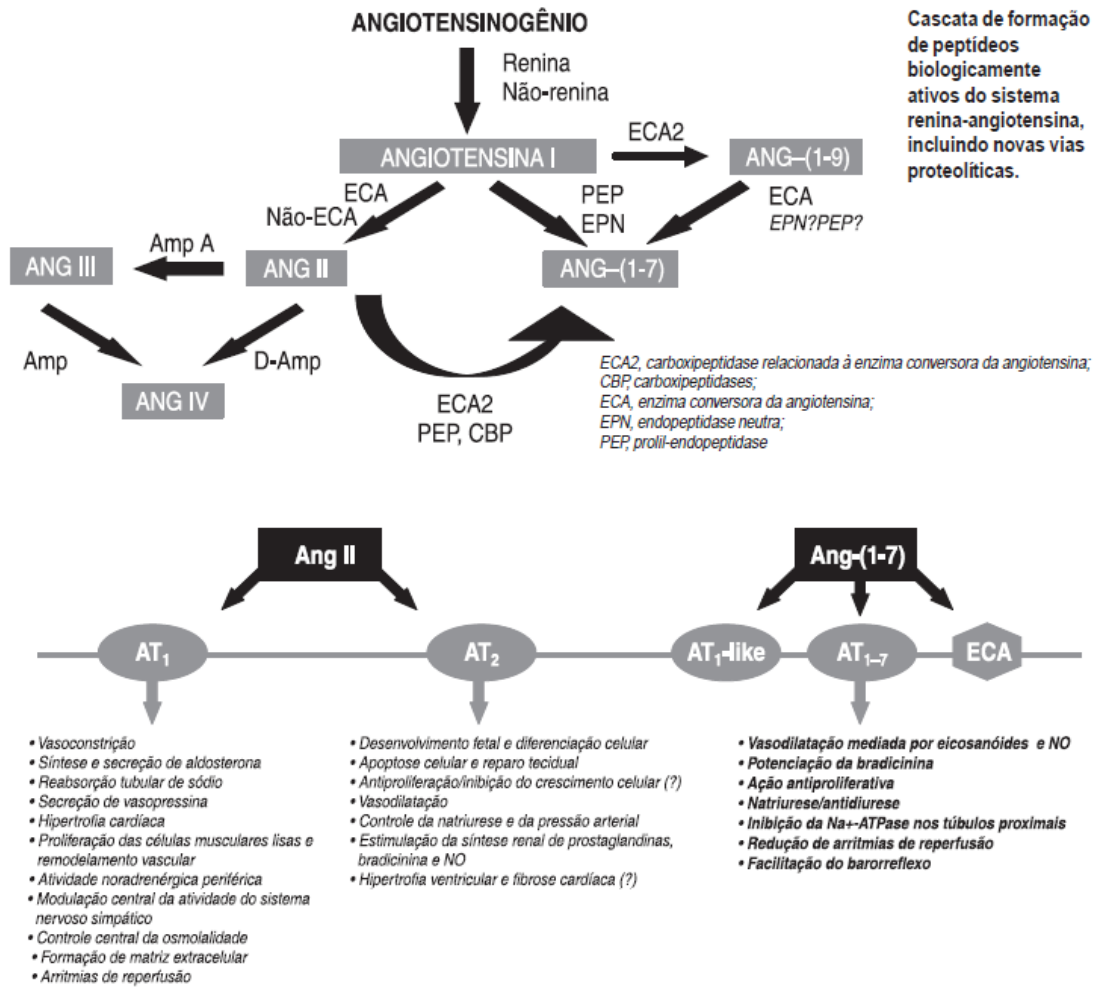


Figura 2 Sistema Renina-Angiotensina. Principais peptídeos biologicamente ativos no SRA e principais ações da Angiotensina II e Angiotensina-(1-7). Adaptada: SANTOS & SAMPAIO, 2002.

1.3.1 Angiotensina-(1-7)

Dentre as recentes descobertas que produziram alterações conceituais de fundamental importância relacionadas a Ang-(1-7), destacam-se a identificação da ECA2 (enzima conversora da angiotensina 2) como a principal enzima responsável pela formação de Ang-(1-7) (DONOGHUE *et al.*, 2000a; TIPNIS *et al.*, 2000a) e a descoberta de um novo receptor acoplado a proteína G, o receptor Mas, como sendo um ligante endógeno para a Ang-(1-7) (SANTOS *et al.*, 2003a). Ang-(1-7) é produzida principalmente através da ação de ECA2, que tem cerca de 400 vezes menos afinidade para Ang I do que a Ang II. Portanto, a Ang II é o substrato principal para síntese de Ang-(1-7) (DONOGHUE *et al.*, 2000a; FERRARIO, 1990; VICKERS *et al.*, 2002). ECA2 pode também formar Ang-(1-7) com menos eficiência através

da hidrólise de Ang I em Ang-(1-9), com a subsequente formação de Ang-(1-7) (VICKERS *et al.*, 2002). A ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) promove, em geral, efeitos antagônicos àqueles atribuídos à ativação do receptor AT1 pela Ang II (SANTOS *et al.*, 2003a), onde se destacam: vasodilatação (LOOT *et al.*, 2002), anti-arritmogênico (SANTOS *et al.*, 2004), anti-fribrotico (PEREIRA *et al.*, 2007), anti-proliferativo (GALLAGHER; TALLANT, 2004; TALLANT; FERRARIO; GALLAGHER, 2005), entre outros. Diante dos resultados, a visão atual do SRA envolve dois eixos opostos: o eixo clássico, responsável pela maioria das ações tradicionalmente atribuídas a esse sistema, e composto pela enzima conversora de angiotensina (ECA), Ang II e o receptor AT1; e o eixo contra-regulatório que é formado pela enzima homóloga da ECA, denominada ECA2 (DONOGHUE *et al.*, 2000b; TIPNIS *et al.*, 2000b), Ang-(1-7) e o receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2003b).

Estudos verificaram que a Ang-(1-7) é um peptídeo importante com atividade biológica em vários órgãos, cuja presença e ações são bastante relevantes (PINHEIRO *et al.*, 2004). Entretanto, há muito a ser pesquisado sobre seu efeito nos processos inflamatórios. Os estudos são escassos e, muitas vezes contraditórios no que diz respeito ao efeito dos agonistas do receptor de Ang-(1-7), receptor Mas, nos processos inflamatórios (BARROSO *et al.*, 2012; DA SILVEIRA *et al.*, 2010b; ESTEBAN *et al.*, 2009; MARRERO; BENCHERIF, 2009). Devido a escassez de estudos sobre os componentes do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas, muitas vezes é necessário inferir os efeitos potenciais da Ang-(1-7) a partir da avaliação do eixo clássico do SRA ou do bloqueio desse eixo por meio de inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECAs) ou antagonistas de seus receptores AT1 (ABU NABAH *et al.*, 2007; NABAH *et al.*, 2004; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001).

Considerando que a Ang-(1-7) pode apresentar efeitos anti-inflamatórios, diminuindo o recrutamento de neutrófilos, como já demonstrado pelo nosso grupo; em um modelo de artrite induzida por antígeno, onde o tratamento com a Ang-(1-7) foi capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos e diminuir o dano tecidual da articulação acometida (DA SILVEIRA *et al.*, 2010b). Recentemente também foi demonstrado no modelo de insuficiência renal aguda, induzida por isquemia e reperfusão, onde o tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE 0991, foi capaz de diminuir o recrutamento de neutrófilos com conseqüente diminuição do dano tecidual (BARROSO *et al.*, 2012). Desta forma, nossa hipótese é que a Angiotensina-(1-7) também possa ter um efeito pró-resolutivo, promovendo a

apoptose de neutrófilos e diminuindo os danos causados pelo excesso dessas células durante a inflamação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito pró-resolutivo do tratamento local com a Angiotensina-(1-7) em camundongos com artrite induzida por antígeno, visando entender melhor a participação da Angiotensina-(1-7) e possíveis mecanismos envolvidos nesse processo.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o infiltrado inflamatório (recrutamento de neutrófilos), apoptose de neutrófilos, vias de sinalização e hipernocicepção em resposta ao tratamento local com Ang-(1-7) na AIA.

Estudar os efeitos da Angiotensina-(1-7) no processo inflamatório e pró resolutivo em animais previamente tratados com o pan inibidor de caspase, Zvad-FMK.

Estudar os efeitos do aumento da síntese endógena de Angiotensina-(1-7) no processo de resolução inflamatória, através da administração de um ativador de ECA2(DIZE).

Estudar o efeito direto da Angiotensina-(1-7) na apoptose de neutrófilos humanos isolados do sangue periférico.

Estudar os efeitos da Angiotensina-(1-7) em um outro modelo de artrite, induzido pela injeção do lipopolissacarideo (LPS).

3. METODOLOGIA

3.1. Utilização de Camundongos e Aprovação do Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA) sob o protocolo de pesquisa número 192/2012.

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 e Balb/c, machos, com peso aproximado de 25 gramas, entre 8-10 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO-ICB/UFMG) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os animais foram mantidos no ciclo claro-escuro de 10-12horas, com livre acesso a água e ração.

3.2. Fármacos e Reagentes

Ketamina (Vetbrands, Brasil), Cloridrato de xilazina (Agener União, Brasil), Albumina de soro bovino metilada (mBSA), Albumina de soro bovino (BSA) e inibidor de caspase (Z-VAD-FMK) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). Angiotensina-(1-7) foi doada pelo professor Robson Augusto Souza dos Santos do departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG e ativador endógeno de ECA2(DIZE), gentilmente cedido pelo professor Anderson José Ferreira, do departamento de Morfologia, ICB/UFMG.

3.3. Preparação das Drogas

A Ang-(1-7), o DIZE e o Z-VAD foram preparados segundo a descrição abaixo:

Ang-(1-7): diluída em PBS 1x estéril e mantida em agitação contínua (vórtex) e no gelo, até o momento do uso.

DIZE: diluído em PBS1X com concentração final de 1µg/kg.

ZVAD-FMK: diluído em 2% de DMSO e PBS 1X estéril, com concentração final de 1mg/kg.

Veículo dos tratamentos: PBS estéril1X

3.4 Modelos Murinos de Artrite Imuno-Induzida

Para investigar o papel do sistema Renina-Angiotensina, no processo de resolução da artrite, foram utilizados dois modelos que reproduzem as principais alterações verificadas na artrite reumatóide.

O primeiro modelo experimental de artrite foi induzido pela injeção intra-articular de albumina de soro bovino metilada (mBSA) (AIA) em animais previamente imunizados com emulsão de mBSA e adjuvante completo de Freund (COELHO *et al.*, 2008a). O segundo modelo experimental de artrite foi induzido por meio de uma injeção intra-articular de lipopolissacarídeo (KYO *et al.*, 2005). Esses modelos, que representam, de forma aguda, a lesão articular, foram utilizados para avaliação dos efeitos obtidos com os tratamentos propostos.

Todos os animais foram anestesiados com solução de cetamina (150mg/kg), xilasina (10mg/kg) diluído em PBS estéril para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos.

3.4.1 Modelo de artrite inflamatória induzida por antígeno (AIA)

Camundongos C57Bl/6 foram imunizados por via intradérmica (id) na base da cauda com 500 µg de albumina sérica bovina metilada (mBSA; Sigma) em 100 µl de uma emulsão de solução salina e volume equivalente de adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma). O desafio com antígeno foi realizado 14 dias após a imunização, sendo que cada animal recebeu uma injeção de mBSA (10µg mBSA em 10 µL solução salina estéril) na articulação fêmur-tibial traseira (COELHO *et al.*, 2008a). Todos os parâmetros inflamatórios foram avaliados 24 horas após o desafio, quando ocorre o pico da resposta inflamatória nesse modelo. A cavidade articular do joelho foi lavada com albumina sérica bovina (BSA 3%) (2 x 5µl) e tecidos periarticulares removidos para avaliação de citocinas, quimiocinas, atividade de MPO (mieloperoxidase), NAG (N-acetil-b-D- glicosaminidas) e Western blot.

3.4.2 Modelo de artrite induzida por LPS

Camundongos Balb/c foram imunizados a partir da administração intra-articular de lipopolissacarídeo(LPS) (100ng/cavidade diluído em 10µl de PBS) na articulação fêmur-tibial traseira. Os animais foram acompanhados 6, 12, 24 e 48 horas após a injeção com LPS, para

definição da cinética de células inflamatórias. O pico da resposta inflamatória ocorreu entre 12 e 24 horas após a injeção com LPS. A cavidade do joelho foi lavada com albumina sérica bovina (BSA 3%) (2 x 5µl) e tecidos periarticulares removidos para avaliação da atividade de MPO (mieloperoxidase), contagem diferencial de células e Western blot.

3.5 Protocolo de Tratamento dos Grupos Experimentais

3.5.1 Modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos (AIA)

Camundongos foram divididos nos seguintes grupos:

CC- controle: camundongos imunizados com emulsão de CFA+ mBSA, desafiados com PBS1X intra-articularmente (10µl) e tratados com PBS1X, 12 horas após o desafio. Tratamento administrado por via intra-articular.

Veic.- Veículo: camundongos imunizados com emulsão de CFA+ mBSA, desafiados com mBSA(10µg em 10µl de PBS) intra-articularmente e tratados com PBS1X, 12 horas após o desafio. Tratamento administrado por via intra-articular

TT Ang.- Tratado: camundongos imunizados com emulsão de CFA+ mBSA, desafiados com mBSA(10µg em 10µl de PBS) intra-articularmente e tratados com Angiotensina-(1-7) ou DIZE (1µg/kg), 12 horas após o desafio. Tratamento administrado por via intra-articular e subcutânea. Quando utilizado o inibidor de caspase, ZVAD-FMK, administração foi feita por via intraperitoneal 15 minutos antes do tratamento com a Angiotensina-(1-7).

3.5.1.1 Tecidos e fluidos coletados

- Lavado articular: foi coletado da articulação fêmur-tibial em solução de BSA3%, para posteriores contagens total e diferencial dos leucócitos e apoptose de neutrófilos.

- Tecidos periarticulares: após a coleta do lavado articular, os tecidos moles das regiões adjacentes à articulação fêmur-tibial foram removidos e estocados em freezer para ensaios de MPO e *Western Blot*.

- Membrana sinovial: as membranas sinoviais que revestem a cavidade articular da articulação fêmur-tibial foram removidas e estocadas a -70° para a realização de ensaios de *Western blot*.

3.5.1.2 Parâmetros avaliados:

- neutrófilos do tecido periarticular;
- contagem total e diferencial das células inflamatórias do lavado articular;
- contagem de neutrófilos apoptóticos do lavado articular;
- hipernocicepção (teste de pressão crescente na pata do camundongo);
- avaliação do fator de transcrição Nf-kB por *Western blot*;

Desenho experimental do modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)

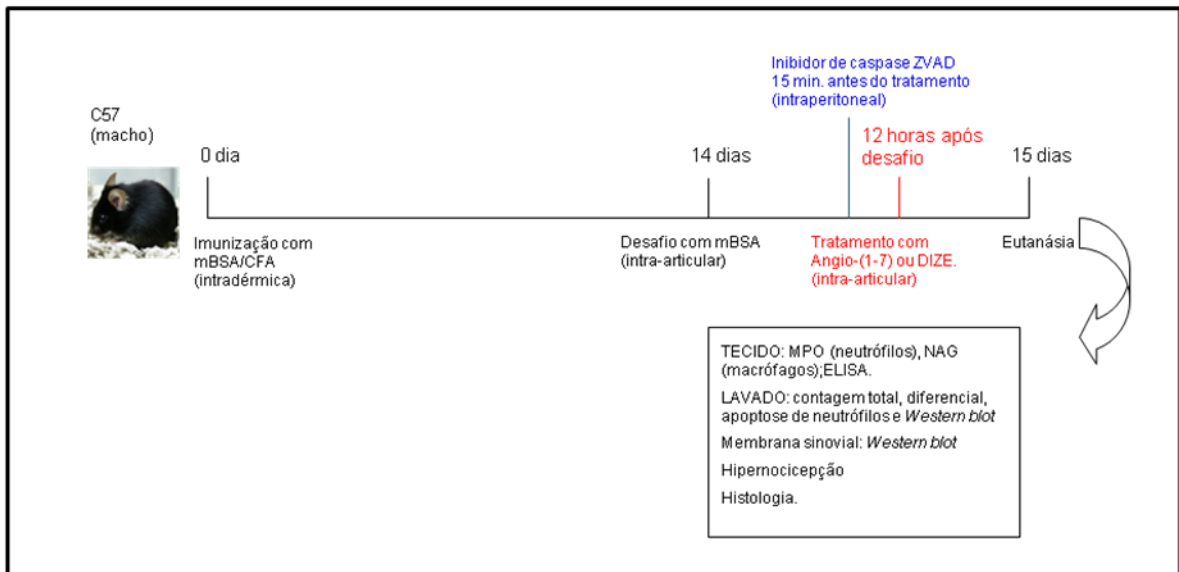


Figura 3 Desenho experimental do modelo de artrite reumatóide induzida por antígeno (AIA).

3.5.2 Modelo de artrite induzida por LPS

Camundongos foram divididos nos seguintes grupos:

CC- controle: camundongos não desafiados com LPS apenas injeção intra-articular de 10µl de PBS1X. Tratamento com 10µl de PBS 1X, 12 horas após a primeira injeção. Tratamento administrado por via intra-articular.

Veic.- Veículo: camundongos desafiados com LPS (100ng/cavidade), injetado intra-articularmente e tratados com PBS1X, 12 horas após a imunização. Tratamento administrado por via intra-articular

Ang.- Tratado: camundongos imunizados com LPS (100ng/cavidade), injetado intra-articular e tratados com Angiotensina-(1-7) (100ng/kg), 12 horas após a injeção de LPS. Tratamento administrado por via intra-articular.

3.5.2.1 Tecidos e fluidos coletados

- Lavado articular: foi coletado da articulação fêmur-tibial em solução de BSA3%, para posteriores contagens total e diferencial dos leucócitos e apoptose de neutrófilos..

- Tecidos periarticulares: após a coleta do lavado articular, os tecidos moles das regiões adjacentes à articulação fêmur-tibial foram removidas e estocadas.

3.5.2.2 Parâmetros avaliados:

-contagem total e diferencial das células inflamatórias do lavado articular;

-contagem de neutrófilos apoptóticos do lavado articular;

Desenho experimental do modelo de artrite induzida por LPS

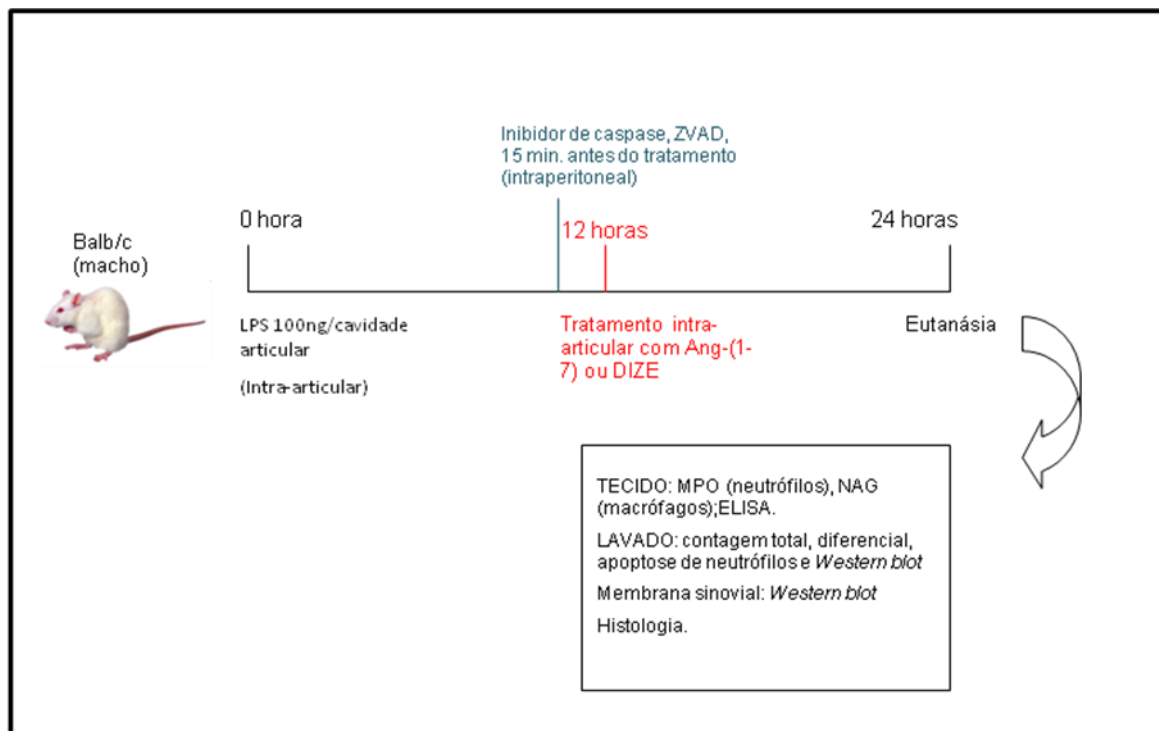


Figura 4 Desenho experimental do modelo de artrite reumatóide induzida por LPS.

3.6 Parâmetros Avaliados

3.6.1 Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular

Após 24h do desafio, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina 150 mg/kg e xilazina 10 mg/kg e sacrificados. Para avaliar a migração de leucócitos (neutrófilos) para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular. Este procedimento consistiu em injetar 10 μ L de uma solução de albumina bovina 3% na cavidade articular, lavando-a três vezes para que uma amostra das células presentes no interior da cavidade fosse coletada juntamente com a solução de albumina recapturada com uma pipeta. Este lavado de células da articulação foi diluído em 90 μ L de albumina bovina 3% para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

3.6.2 Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 20 μ L do lavado articular foram diluídas em 40 μ L de solução Turk, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo da percentagem dos diferentes leucócitos encontrados no lavado articular a partir da contagem/discriminação por visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação sob microscópio óptico.

3.6.3 Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 80 μ L do lavado articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de May-Grumwald e giemsa e examinadas sob microscópio óptico, objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x), usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos x 10⁴/ cavidade articular.

3.6.4 Avaliação da apoptose de leucócitos

A apoptose foi avaliada como descrito por (PINHO *et al.*, 2005). Resumidamente: as células (5×10^4) retiradas 24 horas após o desafio com antígeno ou LPS foram citocentrífugadas, fixadas e coradas segundo a técnica de coloração de May-Grumwald e giemsa e examinadas sob microscópio óptico, objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x) para determinação da proporção de células com morfologia apoptótica .

3.6.5 Quantificação indireta de neutrófilos: atividade da mieloperoxidase (MPO)

3.6.5.1 Processamento tecidual:

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no tecido periarticular de camundongos, foi utilizado o método de quantificação da atividade de MPO como descrito previamente (Dematos, 1999). Resumidamente, o tecido periarticular removido foi pesado e processado com solução de extração de citocinas (conforme descrição na seção anterior). Após homogeneização e centrifugação, o sobrenadante foi coletado e estocado pra quantificação de citocinas. O componente residual (sedimento) foi ressuspensionado em tampão 1 (NaCl 0,1 M, Na_3PO_4 0,02 M, Na_2 EDTA 0,015 M – pH 4,7) na proporção de 1,9 mL para cada 100mg de tecido e submetido à homogeneização e centrifugação (10.000 g, 10 minutos).

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado em NaCl 0.2% gelado seguido por NaCl 1.6% com glicose 5% gelada (1,5 mL para cada 100 mg de tecido). Realizou-se nova centrifugação 10.000 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em tampão 2 (Na_3PO_4 0,05 M, HETAB 0,5% p/v – pH 5,4) e homogenizado por 30 segundos. Todo o volume contido em cada amostra foi congelado e descongelado três vezes seguidas em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram submetidas à nova centrifugação (10.000 g, 15 minutos) e o sobrenadante coletado para ensaio de MPO.

3.6.5.2 Ensaio bioquímico:

As amostras do tecido periarticular foram diluídas (1:3). Em seguida, as amostras foram adicionadas à placa de 96 poços (25µl/poço). Tetramethylbenzine (TMB - 1.6 mM em dimetilsulfóxido) foi adicionado à cada poço 25µl/poço e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Foi adicionado 100 µl/poço de água oxigenada (H₂O₂ -0,002%) e novamente a placa foi incubada a 37°C durante 5 minutos. A reação é interrompida pela adição de 100 µl ácido sulfúrico (H₂SO₄ - 1M). A atividade da MPO das amostras foi detectada por colorimetria em um leitor de ELISA (450 nm). Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos (Unidades Relativas) por comparação da O.D. do sobrenadante do tecido com neutrófilos de peritônio de camundongos processados da mesma maneira.

3.6.6 Avaliação de hipernociceção - teste de pressão crescente na pata de camundongo

Os experimentos foram realizados utilizando o teste de pressão com um anesthesiômetro eletrônico (Insight Equipamentos, São Paulo, Brazil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força (g). O aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 ou 4,15 mm² de diâmetro que é adaptada a ele. Os animais são alocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 10 x 17 cm, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais. O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar 3 medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata.

A intensidade de hipernociceção foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida, subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observados antes do procedimento experimental (0 hora) que correspondia ao período anterior

ao desafio dos animais com mBSA, da média de três valores em gramas (força) 24 horas após o desafio e/ou tratamentos, segundo protocolo experimental específico. Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 16:00 h.

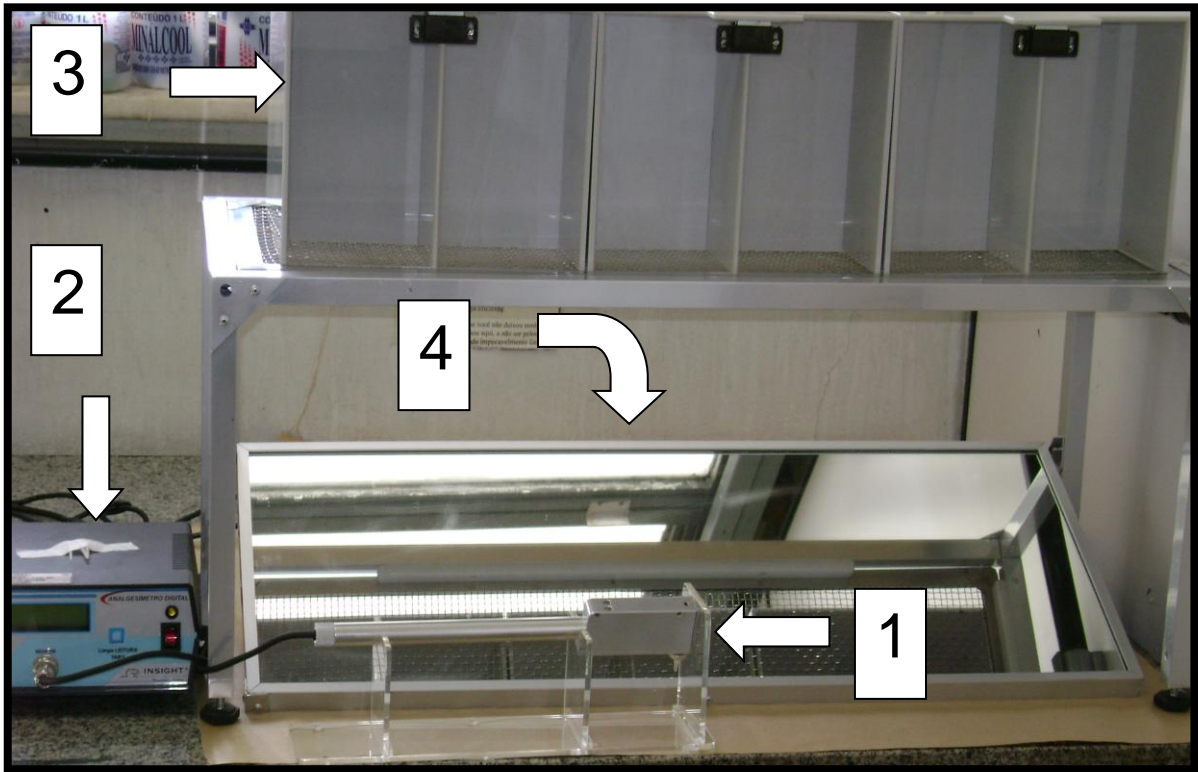


Figura 5 Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo. A foto apresenta o anestesiômetro eletrônico (Insight Equipamentos, São paulo, Brazil), constituído por transdutor de pressão (1) conectado a um contador digital de força (2), as caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura) (3) e os espelhos inclinados (4), abaixo do assoalho que forneceu uma vista desobstruída das patas traseiras dos animais, utilizados no teste de pressão crescente no joelho de camundongos (Foto retirada da tese: “Efeito da modulação farmacológica do sistema renina-angiotensina na artrite experimental”, Kátia Daniela da Silveira).

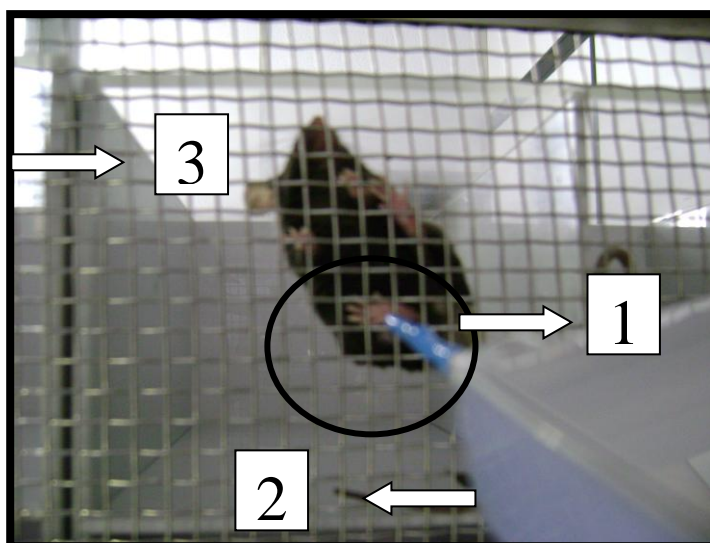


Figura 6 Foto no momento do teste de pressão crescente na pata de camundongo. A foto apresenta a ponteira de polipropileno (1) acoplada ao transdutor de força (2) em contato com a pata do animal (círculo preto). O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede do assoalho (3), uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata até que o animal produza uma resposta caracterizada como “sacudida” (“flinch”) (Foto retirada da tese: “Efeito da modulação farmacológica do sistema renina-angiotensina na artrite experimental”, Kátia Daniela da Silveira).

3.6.7 Avaliação por Western Blot

À membrana sinovial do joelho de camundongos desafiados com mBSA ou PBS 1x, foi adicionado 500 μ l de uma solução de lise (Triton X-100 1%; Tris/HCl 100 mM, pH 8.0; glicerol 10%; EDTA 0.2 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM, NaF 25mM; leupeptina 2,5 μ g/ml; aprotinina 5 μ g/ml e ortovanadato de sódio 1 mM), sendo o tecido macerado com auxílio de homogeneizador de tecido e deixado em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a 4° C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado à -70° C até o momento de uso. A concentração das proteínas totais foi determinada por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad Laboratories USA), por método de Bradford.

Amostras contendo 40 μ g de proteínas totais foram fracionadas em gel de poli-acrilamida/SDS (PAGE) 10% a 100 V por 1,5 h e transferidos para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), conforme protocolo do “Kit Bio-Rad Transference” (Bio-Rad Laboratories, USA). Após transferência, as membranas foram coradas com “ponceau” para visualização da eficiência da mesma, além da informação previa sobre a equivalência das quantidades de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas. As

membranas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente, utilizando-se PBS1x contendo 0,1% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado.

As membranas foram primeiramente lavadas por três vezes em PBS 1x contendo 0,1% de Tween-20, e posteriormente incubadas com o anticorpo policlonal anti-pP65 (Cell Signaling, USA) a 4°C por 18-20 horas em solução de PBS/Tween contendo 5% de BSA. As membranas foram lavadas novamente em PBS/Tween por três vezes e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-coelho ligado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:3000 em solução PBS/Tween contendo 5% de leite em pó desnatado. Após nova sessão de lavagens (3 vezes em PBS/Tween), as membranas foram incubadas em solução reveladora “ECL-Plus” (GE Healthcare, Piscataway, NJ), expostas contra filme de raio X em intervalos de 30 segundos a 20 minutos (Hyperfilm ECL, Amersham, Pharmacia), e revelados utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante. Como controle interno da quantidade de extratos protéicos aplicados às diferentes canaletas foi realizado o *immunoblot* das membranas com o anticorpo anti- β -actina (Sigma Aldrich).

3.6.8 Protocolo de extração de neutrófilos de sangue periférico humano e cultura celular.

As amostras de sangue foram coletadas de doadores voluntários e os neutrófilos separados por gradiente de densidade após centrifugação com histopaque. Ao sangue doado foi adicionado o mesmo volume de meio RPMI. Em um tubo Falcon de 15ml foi adicionado 3ml de histopaque 11191(Sigma Aldrich) e 3 ml de histopaque 10771(Sigma Aldrich) de modo a formar 2 camadas. Foi adicionado sobre a camada de histopaque 10771, 6ml de sangue (diluído em RPMI), formando uma terceira camada. Os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm, por 30 minutos a 24 °C . Posteriormente a centrifugação foi possível observar a formação de 5 camadas (soro, PBMC, histopaque, neutrófilos e hemácias), os neutrófilos foram retirados e armazenados em um tubo Falcon de 50ml, e adicionado meio RPMI ate completar o volume total, o homogenato foi submetido a nova centrifugação, 1.300rpm por 15 minutos a 24°C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento adicionado 1ml de meio RPMI, 18 ml de água gelada e 2 ml de PBS10X, e o homogenato foi novamente centrifugado(1.300rpm,15minutos 24°C). O sobrenadante foi descartado e ao **pellet** adicionado 1 ml de meio RPMI, para contagem do número de neutrófilos.

Alíquotas de 10µL foram diluídas em 90 µL de azul de tripan, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo do número de leucócitos a ser utilizado na cultura celular e da percentagem de células apoptóticas encontrados a partir da contagem/discriminação por visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação sob microscópio óptico.

Para a cultura celular, 1×10^6 neutrófilos foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços, em volume final de 200 µL de meio RPMI por poço. Nas células que receberam o tratamento com a Angiotensina-(1-7), foram adicionados 150 µL de meio RPMI e 50 µL de Angiotensina-(1-7), nas concentrações de 30,100 e 300nm, diluída em meio RPMI. Para análise de Western Blot as células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 2 horas e para contagem do número de células apoptóticas por 6 horas, nas mesmas condições.

3.6.9 RT-PCR – Reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa

3.6.9.1 Extração do RNA

As amostras (neutrófilos de sangue periférico humano, 1×10^6), foram homogeneizadas em 1 mL de TRIZOL (GIBCO/BLR Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA) utilizando-se um homogeneizador elétrico. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 a 10 minutos a uma temperatura de 15° a 30° C, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de Clorofórmio de alta qualidade para cada 1 mL de TRIZOL. Foi realizada agitação em *vortex* e depois incubação por 3 min de 15° a 30° C. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 2 a 8° C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior (rosa), contendo fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permaneceu exclusivamente na fase aquosa que foi transferida para um microtubo novo. O RNA foi precipitado com isopropanol (MERCK) de altíssima qualidade (500µl de isopropanol para cada 1ml de TRIZOL) e acetato de sódio na concentração de 3M na proporção de 1:20 (50 µl para cada 1 ml de solução). As amostras foram incubadas por 10 min a 15 a 30°C e então centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 2 a 8°C e foi formado um pellet branco. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de etanol 75% (diluído em

água tratada com DEPC) para 1ml de TRIZOL. O tubo foi agitado no vortex para que o sedimento se soltasse do fundo. Então, foi realizada nova centrifugação a $7.500 \times g$ (10.000 rpm) por 5 min a 2 a 8°C . Após descarte do sobrenadante, o tubo foi deixado aberto por 5 minutos para secagem do sedimento que foi, em seguida, diluído em água de alta qualidade tratada com DEPC, em volume suficiente para diluir toda a amostra. O RNA foi estocado a -70°C .

3.6.9.2 Quantificação do RNA

A quantificação das amostras de RNA foi feita no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Primeiramente, foi feita a calibração do aparelho com água de alta qualidade tratada com DEPC e, em seguida, foi selecionada a opção de leitura de RNA já definida no aparelho. A leitura do branco também foi feita com água tratada com DEPC. O RNA foi quantificado pela absorção a 260nm utilizando-se 2 μl da amostra pura. O aparelho fornece a concentração em ng/ μL e a correlação 260/280 (RNA/proteínas).

3.6.9.3 Preparo do cDNA por Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais foi realizada utilizando-se 2,0 μg de RNA aos quais foi adicionado 50 μM do primer Oligo dT (15) (Promega Cor., Madison WI, EUA). Foi feita uma incubação por 5 minutos a 70°C e em seguida por 5 minutos no gelo para permitir a separação das fitas de RNA e o anelamento do *primer* e para impedir a formação de artefatos inespecíficos, respectivamente. Em seguida, foi adicionada uma mistura de reagentes em um volume de 14,5 μl contendo 1,5 μl de dNTPs a 100 mM (Promega Cor., Madison, WI, EUA) , 4 μl tampão M-MLV 5X (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 200 U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 8,5 μl de água Milli-Q autoclavada. A mistura foi incubada por 2 horas a 42°C quando ocorreu a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C .

3.6.9.4 PCR específica

Para as reações subseqüentes de amplificação, 5µl da amostra de cDNA foram utilizadas. A PCR foi realizada em um volume final de 20µl contendo 10µL de Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied biosystems, Foster City, CA, EUA), 1,5µl de primer senso a 5µM, 1,5µl de primer anti-senso a 5µM e 2µl de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando-se o protocolo para PCR com SYBR Green do termociclador Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em resumo, foi feita uma incubação inicial de 1 minuto a 95°C e, em seguida, 15 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto para anelamento e extensão a 60°C. Esses dois últimos passos foram repetidos 40 vezes e depois foi feita a curva de *melting*: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e uma rampa de subida lenta de temperatura até 95 °C. Os resultados foram obtidos com auxílio do software Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se as seguintes fórmulas: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ o valor de calibração encontrado através da subtração das médias do Ct do grupo controle. Em que $\Delta Ct = Ct$ da gene alvo – Ct do gene constitutivo humano (GAPDH). As seqüências dos iniciadores utilizados foram as seguintes:

- receptor MAS humano:

primer senso- 5'- TTCCGGATGAGAAGAAATCC - 3',

primer anti-senso- 5'-ATGGCCAGAAGAAAGCTCAT-3',

- GAPDH:

senso 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3',

anti-senso 5'-GAGGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'.

3.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software Prisma, versão 4,0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguidas por pós-teste Student-Newman-Keuls. A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos pró-resolutivos da Angiotensina-(1-7) em camundongos com artrite induzida por antígeno (AIA)

Estudos prévios do nosso grupo, avaliando a cinética do processo inflamatório no modelo de artrite induzida por mBSA, demonstraram a ocorrência de um aumento progressivo das células inflamatórias (neutrófilos) no tecido periarticular, bem como na cavidade articular acometida, sendo o pico da migração de neutrófilos entre 12 e 24 horas (LOPES *et al.*, 2011b). Dessa forma o efeito pró-resolutivo da administração da Angiotensina-(1-7), foi observado 24 horas após o desafio com o antígeno (mBSA), sendo a administração da Ang-(1-7) realizada 12 horas após o desafio.

A artrite induzida por antígeno produziu um aumento significativo no recrutamento de neutrófilos na cavidade sinovial 24 horas após o desafio, quando comparado com os animais do grupo controle (CC), que não foram desafiados com mBSA. No entanto, a administração da Ang-(1-7) na cavidade articular, 12 horas após o desafio, foi capaz de diminuir, de modo significativo, o número de neutrófilos na cavidade sinovial. Esse efeito foi revertido pela administração do Zvad-FMK (inibidor de caspase), 15 minutos antes da administração da Ang-(1-7) (Figura 7 A). Além disso, o número de neutrófilos apoptóticos encontrados na cavidade sinovial dos animais que receberam o tratamento com Ang-(1-7) foi significativamente maior que os animais desafiados que não receberam o tratamento. Esse efeito também foi inibido no grupo que recebeu o Zvad antes da Ang-(1-7) (Figura 7B). A atividade da enzima mieloperoxidase apresentou-se bastante elevada no tecido periarticular dos animais desafiados que não receberam tratamento, quando comparados com o grupo controle (CC). Esse aumento de neutrófilos no tecido não foi observado nos animais que receberam o tratamento com a Ang-(1-7). No entanto, o efeito do tratamento foi revertido quando administrado 15 min após o Zvad (Figura 7C).

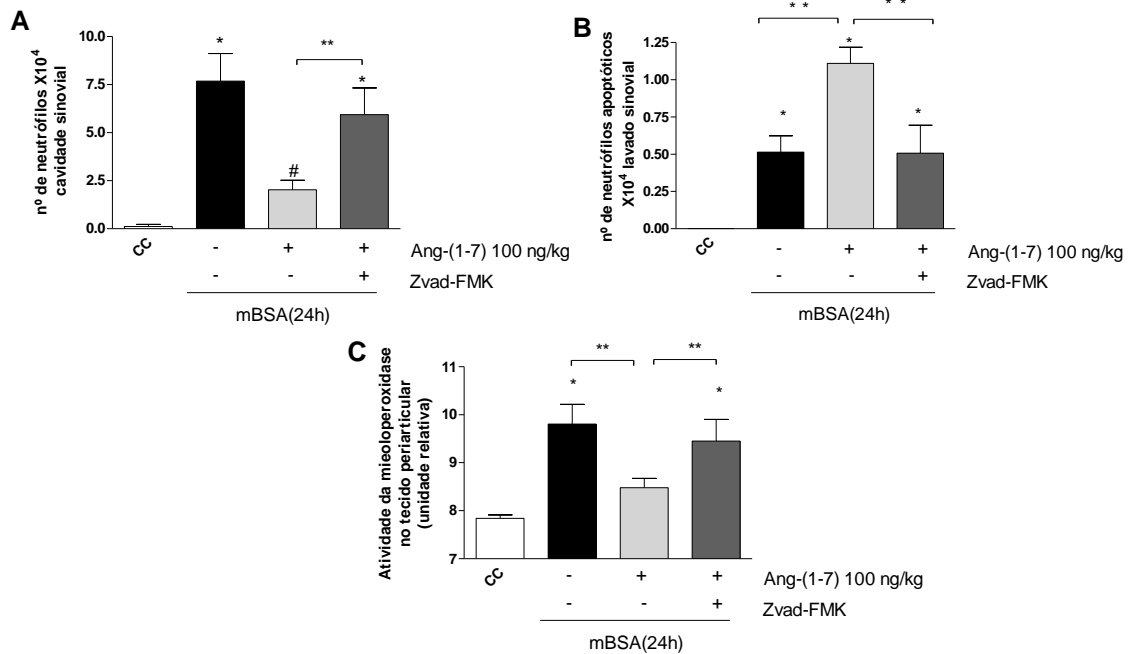


Figura 7 Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7), na resolução inflamatória em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). Ang-(1-7) (100ng/kg) ou veículo (PBS 1X estéril) foram administrados por via intra-articular 12 horas após o desafio com mBSA, o grupo de animais tratados com Zvad (1mg/kg por via intra-perioteneal) recebeu o tratamento 15 minutos antes da injeção de Ang-(1-7). O número de neutrófilos na cavidade sinovial (A), o número de neutrófilos apoptóticos no lavado sinovial (B) e o número relativo de neutrófilos no tecido periarticular, determinado pela atividade da enzima mieloperoxidase (C) foram avaliados 24h após a indução da artrite. As barras representam a média \pm -EPM de 6 camundongos por grupo. (*) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (CC) e (#) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1X) (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).

Foi também analisada a hipernociceção nos animais 24 horas após o desafio. Os animais do grupo desafiado, que não recebeu o tratamento, foram capazes de suportar por menos tempo a pressão na pata, retirando-a mais rapidamente quando comparados com os animais do grupo controle (CC), que não foi desafiado com o antígeno. No entanto, os animais que receberam a Ang-(1-7) ou a Ang-(1-7) juntamente com o Zvad, não apresentaram diferenças quanto a hipernociceção no tempo observado, retirando a pata de forma semelhante aos animais desafiados com mBSA sem tratamento (grupo veículo) (Figura 8).

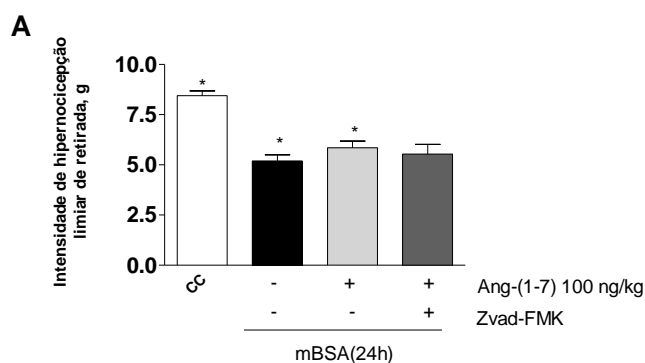


Figura 8 Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7) na hipernociceção, em um modelo de artrite induzida por antígeno. Ang-(1-7) (100ng/kg) ou veículo (PBS 1X estéril) foram administrados por via intra-articular 12 horas após o desafio com mBSA, o grupo de animais tratados com Zvad (1mg/kg por via intra-arterial) recebeu o tratamento 15 minutos antes da injeção de Ang-(1-7). A intensidade de hipernociceção (A) foi avaliada 24h após a indução da artrite. As barras representam a média \pm EPM de 6 camundongos por grupo. (*) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (CC) e (#) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1X) (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).

Dados obtidos até o momento, indicaram que a apoptose foi o mecanismo responsável pela diminuição do número de neutrófilos no lavado sinovial, assim como no tecido periarticular (Figura 7). Podemos observar que o tratamento com a Ang-(1-7) induziu a apoptose de neutrófilos no lavado sinovial, como mostrado pelos critérios morfológicos (Figura 7 B e 9), e a apoptose foi impedida pelo inibidor de caspase, Zvad. Exemplos de neutrófilos apoptóticos podem ser observados na figura 9 (E,F e G).

4.2 Efeito do ativador endógeno de ECA2, DIZE, em camundongos com artrite induzida por antígeno (AIA)

Diante dos resultados obtidos com o tratamento intra-articular com a Ang-(1-7) em animais com AIA (Figura 7, 8 e 9), foi avaliado o efeito do estímulo à síntese de Ang-(1-7), de forma endógena, através da administração de um ativador de ECA2, DIZE. A ECA2 é a principal enzima responsável pela produção de Ang-(1-7) (DONOGHUE *et al.*, 2000b; TIPNIS *et al.*, 2000a).

O tratamento com o DIZE, administrado por via intra-articular na concentração de $1 \mu\text{g/kg}$ em $10 \mu\text{l}$, apresentou efeitos semelhantes ao tratamento com a Ang-(1-7) (Figura 7). O DIZE diminuiu o número total de células (Figura 10 A), reduziu o número de neutrófilos

(Figura 10 B) e aumentou a porcentagem de neutrófilos apoptóticos (Figura 10 C) no lavado sinovial, quando comparados com o grupo de animais que receberam veículo , assim como com o grupo de animais que recebeu o Zvad 15 minutos antes do tratamento com a Ang-(1-7). A atividade da enzima mieloperoxidase também foi avaliada, indicando uma redução significativa no número de neutrófilos no tecido periarticular nos animais tratados com o DIZE, quando comparados com os animais do grupo veículo. De forma interessante, os animais que receberam o tratamento com DIZE posterior ao Zvad não apresentaram redução do número de neutrófilos no tecido periarticular, de forma semelhante ao grupo não tratado (veículo), indicando, mais uma vez, a participação direta da apoptose nesse processo (Figura 10D).

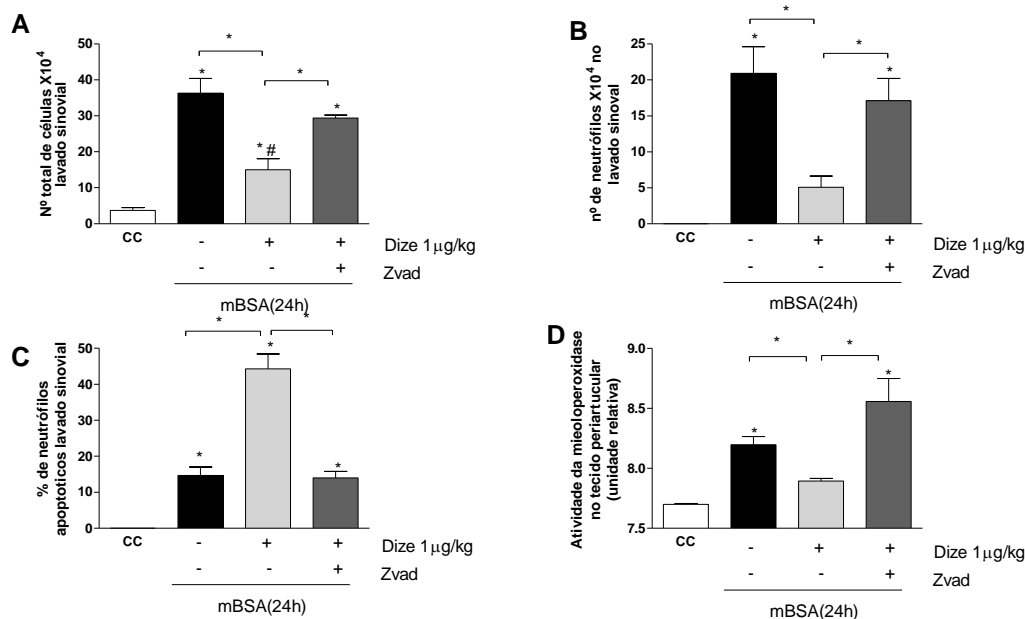


Figura 9 Efeito da administração local de DIZE (ativador endógeno de ECA2) na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). O DIZE (1 μg/kg) ou veículo (PBS 1X estéril) foram administrados por via intra-articular 12 horas após o desafio com mBSA, o grupo de animais tratados com Zvad (1mg/kg por via intra-periteneal) recebeu o tratamento 15 minutos antes da injeção de Ang-(1-7). O número de células totais na cavidade sinovial (A), número de neutrófilos na cavidade sinovial (B), o número de neutrófilos apoptóticos na cavidade sinovial (C) e o número relativo de neutrófilos no tecido periarticular, determinado pela atividade da mieloperoxidase (D). As barras representam a média \pm EPM de 6 camundongos por grupo. (*) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (CC) e (#) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1X) (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).

4.3 Efeito da Angiotensina-(1-7) e do ativador de ECA2, DIZE, nos níveis de NF-κB.

Para avaliar a fosforilação da principal subunidade de Nf-κB, p65, para o núcleo, foi realizado *Western Blot* de células da membrana sinovial. Os dados sugerem uma menor ativação de Nf-κB para o núcleo das células nos animais que receberam Angiotensina-(1-7), assim como os que receberam o tratamento com o DIZE. Esse efeito não foi observado nos animais que receberam veículo e também nos que receberam o Zvad juntamente com a Ang-(1-7) (Figura 11 A). No entanto, mais experimentos serão realizados para a confirmação desses dados.

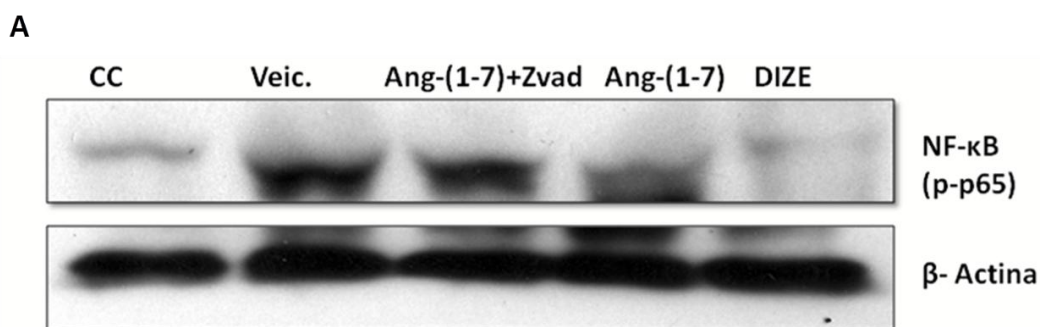


Figura 10 Efeito da Angiotensina-(1-7), do ativador de ECA2, DIZE, nos níveis de NF-κB. Western blot de células da membrana sinovial para NF-κB (p-p65). A proteína foi avaliada 12h após o tratamento com as drogas, ou seja, 24 horas após o desafio com mBSA. Blots representativos de dois experimentos independentes em pools de células de pelo menos dois animais. Para controle, as membranas foram avaliadas com anti-βactina.

4.4 Ação da Angiotensina-(1-7) em neutrófilos humanos.

O experimento seguinte foi realizado a fim de avaliar a ação da Ang-(1-7) diretamente na apoptose de neutrófilos, já que os experimentos anteriores demonstraram a participação da Angiotensina-(1-7) na antecipação da resolução inflamatória, mas não ficou claro se a sua atuação seria diretamente nos neutrófilos. Para tal, foi realizada a contagem de neutrófilos humanos com características morfológicas de apoptose após incubação de 6 horas com Ang-(1-7) nas concentrações de 30, 100 e 300nm/50μl e também Western Blot para determinação do status de ativação de NF-κB. Os resultados indicaram um aumento na porcentagem de apoptose nas três doses avaliadas, quando comparadas com os neutrófilos que não foram incubados com Ang-(1-7) por 6h (CC) assim como com os neutrófilos que passaram apenas pelo processo de separação (CC0h) (Figura 12 A). Os dados também sugerem uma menor translocação do Nf-κB para o núcleo das células quando essas foram incubadas com Ang-(1-7) nas três doses avaliadas, em comparação as células controles, que não foram incubadas com a Ang-(1-7) (Figura 12B).

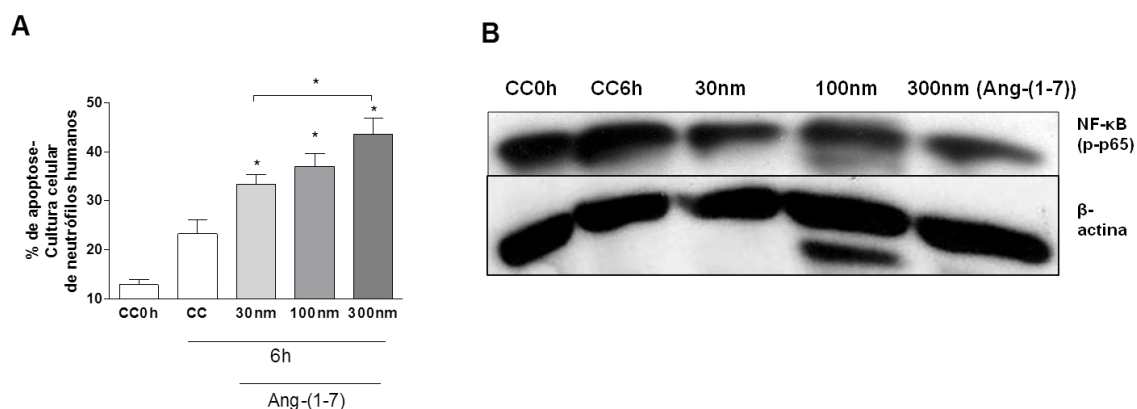


Figura 11 Efeito da Angiotensina-(1-7) em cultura de neutrófilos humanos do sangue periférico. Ang-(1-7) (1×10^6 células em $150 \mu\text{l}$ RPMI, tratadas 30,100 ou 300nm/ $50 \mu\text{l}$ de Ang-(1-7)), CC (1×10^6 células em $150 \mu\text{l}$ RPMI, sem tratamento $50 \mu\text{l}$ de RPMI), incubadas por 6 horas, CC0h (1×10^6 células em $150 \mu\text{l}$ RPMI, sem tratamento $50 \mu\text{l}$ de RPMI) sem incubação. A porcentagem de células apoptóticas foi avaliada 6 horas após a incubação com Ang-(1-7) e o CC0h para controle do procedimento (A). (B) Western Blot, NF- κ B p-p65, 1×10^6 neutrófilos CC0h, CC6h, 6h com 30/100/300nm/ $50 \mu\text{l}$ de Ang-(1-7), para controle as membranas foram avaliadas com β actina. As barras representam a média \pm EPM de 6 camundongos por grupo. (*) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (CC) e (#) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1X) (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).

4.5 Presença do receptor MAS em neutrófilo humano do sangue periférico

O experimento seguinte foi realizado a fim de identificar a presença do receptor MAS em neutrófilos humanos, já que foi demonstrado que a Ang-(1-7) estaria atuando nessas células. Para tal, foi realizado PCR em tempo real, para identificar a expressão do receptor MAS (Figura 13). GAPDH, um gene constitutivo, foi utilizado como controle positivo da reação (Figura 13 A) e a curva de MELT foi realizada para controle da reação, a fim de comprovar a amplificação específica do mRNA de GAPDH (Figura 13B). A presença do receptor MAS nos neutrófilos humanos foi mostrada através da presença do mRNA do gene de interesse (Figura 13C) e a curva de MELT (Figura 13D) foi realizada para controle da amplificação específica de mRNA do receptor MAS.

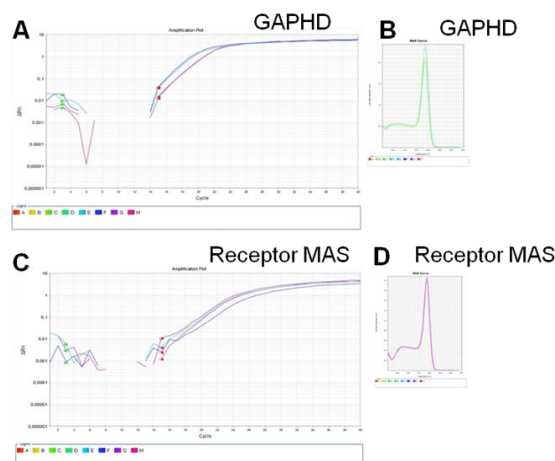


Figura 12 Presença do receptor MAS em neutrófilos do sangue periférico humano. 1×10^6 células (neutrófilos) em $150 \mu\text{l}$ de RPMI. GAPDH, gene constitutivo, utilizado como controle positivo da amostra (A), curva de MELT controle para amplificação específica para o mRNA de GAPDH (B), presença do mRNA do receptor MAS (C), curva de MELT, controle para a amplificação específica do mRNA do receptor MAS (D).

4.6 Ação da Ang-(1-7) no modelo de artrite induzida por LPS

Diante dos resultados obtidos com a Ang-(1-7) no modelo de artrite induzida por antígeno, foi avaliada a hipótese de que a Ang-(1-7) também teria os mesmos efeitos no modelo de artrite induzida por LPS.

O tratamento com a Ang-(1-7) na cavidade articular 12 horas após a injeção de LPS foi capaz de diminuir o número total de células (Figura 14 C), assim como o número de neutrófilos (Figura 14 A) no lavado sinovial, quando comparados com o grupo de animais que recebeu a injeção de LPS e não recebeu tratamento (grupo veículo). De forma interessante, o número de neutrófilos apoptóticos (Figura 14 B) no lavado articular dos animais que receberam o tratamento com a Ang-(1-7) teve um aumento significativo.

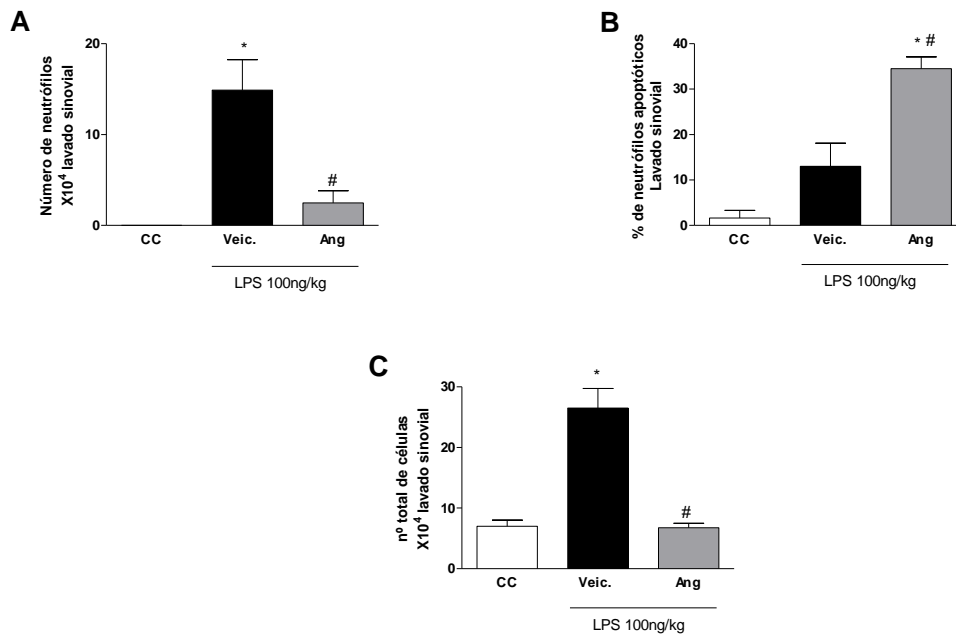


Figura 13 Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7) em um modelo de artrite induzida por LPS. Ang-(1-7) (100ng/kg) ou veiculo (PBS 1X estéril) foram administrados por via intra-articular 12 horas após a injeção por LPS, número de neutrófilos no lavado sinovial (A), a porcentagem de neutrófilos apoptóticos do lavado sinovial (B) e a contagem de células totais no lavado sinovial (C), foi avaliada 24h após a indução da artrite. As barras representam a média \pm -EPM de 6 camundongos por grupo. (*) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (CC) e (#) para $p \leq 0,05$ quando comparado a média do grupo veiculo (artrítico não tratado, PBS1X) (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi avaliada a ação da Angiotensina-(1-7) na resolução da resposta inflamatória, nossos principais resultados foram: (i) Ang-(1-7), em diferentes doses, foi capaz de diminuir o número de neutrófilos no tecido periarticular e no lavado sinovial, na articulação de animais com artrite induzida por antígeno; (ii) a Ang-(1-7) foi capaz de antecipar a resolução da inflamação e essa antecipação foi devido ao aumento de apoptose; (iii) o ativador de ECA2, DIZE, foi capaz de antecipar a resolução da inflamação e essa antecipação foi pelo aumento de apoptose, de forma semelhante a Ang-(1-7); (iv) O DIZE e a Ang-(1-7) foram capazes de diminuir a ativação de NF- κ B; (v) a Ang-(1-7) aumentou a taxa de apoptose diretamente em neutrófilos e inibiu NF- κ B nessas células; (vi) a Ang-(1-7) foi capaz de antecipar a resolução da resposta inflamatória no modelo de artrite induzida por LPS, indicando que sua ação pró-resolutiva não está associada apenas ao modelo de artrite induzida por antígeno. Deste modo, este trabalho fornece forte evidência de que a Angiotensina-(1-7) promove a indução da resolução inflamatória por promover apoptose de neutrófilos.

Ao longo da última década foram demonstradas diversas evidências de que a Angiotensina-(1-7) apresenta efeitos opostos àqueles verificados pela Ang II, sob condições fisiopatológicas, tais como: vasoconstrição, hipertrofia celular, fibrose, formação de radicais de superóxido, ativação do sistema nervoso simpático, secreção de endotelina e aldosterona (CAREY; SIRAGY, 2003b; FERREIRA *et al.*, 2010; GROBE *et al.*, 2007; IWATA *et al.*, 2005; MERCURE *et al.*, 2008; SANTIAGO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2004). Muitos estudos também têm demonstrado que o SRA desempenha um papel importante na patogênese de doenças inflamatórias, mas a maioria das ações pró-inflamatorias conhecidas do SRA, são devido aos efeitos da Ang II, mediada pelo receptor AT1 (CAPETTINI *et al.*, 2012; SUKUMARAN *et al.*, 2011; SUKUMARAN *et al.*, 2012). Mais recentemente, foi demonstrado que o eixo contra regulatório do SRA, ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas, também pode influenciar nas respostas inflamatórias, por exemplo, modulando negativamente a migração de leucócitos, expressão e liberação de citocinas (AGARWAL *et al.*, 2012; BARROSO *et al.*, 2012; DA SILVEIRA *et al.*, 2010b; EL-HASHIM *et al.*, 2012). No entanto, os mecanismos de ação da Ang-(1-7) nos processos inflamatórios ainda não estão bem elucidados.

Esse estudo avaliou o efeito da Ang-(1-7), em animais com artrite induzida por antígeno e os resultados obtidos indicam que o tratamento com a Ang-(1-7) foi capaz de diminuir o número de neutrófilos na cavidade sinovial e no tecido periarticular. A diminuição do número de neutrófilos no tecido periarticular e na cavidade sinovial pela administração sistêmica de Ang-(1-7) foi demonstrada no trabalho de Silveira *et al.* (2010), onde, tanto o tratamento com Ang-(1-7), quando o tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE0991, foi capaz de reduzir o influxo de neutrófilos, melhorando a artrite em camundongos e ratos. Os dados encontrados no nosso estudo também corroboram com os resultados obtidos por Barroso *et al.* (2012), onde o tratamento com AVE 0991, no modelo de isquemia renal bilateral por 30 minutos e reperfusão de 24 horas, foi capaz de diminuir o número de neutrófilos no rim, com conseqüente diminuição do dano tecidual. No entanto, Esteban *et al.* (2010) mostraram, em um modelo de isquemia renal unilateral por 25 minutos, com nefrectomia do rim contralateral, que a Ang-(1-7) apresenta efeitos pró-inflamatórios, aumentando o infiltrado de leucócitos, IL-6 e a translocação de NF- κ B para o núcleo (BARROSO *et al.*, 2012; DA SILVEIRA *et al.*, 2010b).

No modelo de artrite induzida por antígeno, a célula que predomina no infiltrado celular é o neutrófilo (COELHO *et al.*, 2008b). O neutrófilo é a primeira célula de defesa do organismo a chegar no local da lesão e é um célula de extrema importância frente a infecções por microorganismos patogênicos (PRINCE *et al.*, 2011b). No entanto, a presença de neutrófilos em excesso pode causar lesões (CASCAO *et al.*, 2010b), como no caso da AIA e gota (AMARAL *et al.*, 2012; DA SILVEIRA *et al.*, 2010b). Desse modo, em doenças com predomínio de neutrófilos, onde esses são potencialmente lesivos, antecipar a sua eliminação através de apoptose, com conseqüente resolução da resposta inflamatória, pode acarretar uma diminuição da lesão tecidual (MILOT; FILEP, 2011b). Como podemos observar, o tratamento intra-articular com a Ang-(1-7) foi capaz de diminuir o número de neutrófilos no lavado sinovial, assim como no tecido periarticular. Tal diminuição foi devido ao aumento de apoptose de neutrófilos, já que o Zvad, amplo inibidor de caspases, administrado previamente ao tratamento com a Ang-(1-7), foi capaz de reverter seus efeitos. Como se sabe, a indução da apoptose acelera o processo de resolução da resposta inflamatória, já que a apoptose é um ponto crucial nesse processo (LOPES *et al.*, 2011b; MILOT; FILEP, 2011b). Desse modo, os resultados obtidos com o tratamento com a Ang-(1-7) indicam a ação pró-resolutiva desse peptídeo por antecipar a apoptose de neutrófilos. Esses achados corroboram com o que foi

observado por Vago et. al (2012), onde a anexina A1, no modelo de pleurisia induzida por LPS, foi capaz de antecipar a resolução da resposta inflamatória por induzir a apoptose de neutrófilos e esse efeito da anexina A1 também foi revertido quando administrada juntamente com o Zvad, indicando que seus efeitos são de fato por induzir a apoptose.

Um dos mais importantes sintomas que acompanham a artrite reumatóide é o aumento da sensibilidade articular à dor, que é a principal causa das limitações funcionais do paciente (HALLERT *et al.*, 2004). A hipernocicepção articular resulta, principalmente, de efeitos diretos e indiretos de mediadores inflamatórios que sensibilizam fibras nociceptivas primárias que inervam a articulação inflamada (MCDOUGALL, 2006; SCHAIBLE; EBERSBERGER; VON BANCHET, 2002; SCHAIBLE; GRUBB, 1993). Essa dor proveniente de eventos inflamatórios é conhecida como dor inflamatória. Recentemente foi descrito que a Ang-(1-7) participa da modulação da percepção da dor, por meio da ativação do receptor Mas. Esse efeito foi descrito no trabalho de Costa et. al (2012), onde a Ang-(1-7) produziu um efeito antinoceptivo, dose-dependente, em ratos que receberam injeção na pata com prostaglandina E2. Efeito esse revertido com o tratamento com o antagonista do receptor Mas, o A779 (COSTA *et al.*, 2012). No entanto, no experimento, onde avaliamos a hipernocicepção dos animais 12 horas após o tratamento com Ang-(1-7), não observamos o efeito antinoceptivo desse peptídeo. Esse fato pode estar relacionado com a dor inflamatória e com a atividade prolongada das fibras nervosas sensoriais, que resultam em uma sensibilização central (CURY *et al.*, 2011), de modo que, no tempo de 12 horas ainda não tenha ocorrido a dessensibilização das fibras, com consequente antinocicepção.

Além de avaliar o efeito da administração direta de Ang-(1-7), esse estudo avaliou o estímulo a produção endógena de Ang-(1-7), através do tratamento, por via intra-articular, com o ativador endógeno de ECA2, DIZE (PEREGRINE; MAMMAN, 1993; XU; SRIRAMULA; LAZARTIGUES, 2011). Foi observado que o tratamento com o DIZE, produziu resposta semelhante ao tratamento com a Ang-(1-7), antecipando a resolução da resposta inflamatória, por meio da diminuição do número de neutrófilos no lavado sinovial e no tecido periarticular, assim como do aumento da porcentagem de neutrófilos apoptóticos. Em outro estudo, foi visto que o DIZE, assim como a Ang-(1-7), foi capaz de atenuar a dimensão do infarto cerebral e deficiências neurológicas, em um modelo de isquemia cerebral. Essa ação foi inibida pelo antagonista do receptor MAS, A779 (MECCA *et al.*, 2011), indicando que o DIZE atua através do eixo contra-regulatório do SRA, ativando ECA2

e produzindo efeitos semelhantes aos da Ang-(1-7), como visto nos nossos experimentos. No entanto, devido a problemas técnicos, ainda não foi possível mensurar a quantidade de Ang-(1-7) produzida pela ativação de ECA2 pelo DIZE.

Foi possível verificar a diminuição da ativação de NF- κ B, visto pela fosforilação de p65, na membrana sinovial de animais tratados com Ang-(1-7) e DIZE, assim como em neutrófilos humanos incubados com a Ang-(1-7). Esse fator de transcrição desempenha um papel crucial na sobrevivência de granulócitos humanos (DAMGAARD; GYRD-HANSEN, 2011; FUJIHARA *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2004). O NF- κ B também controla vias de sobrevivência de células induzindo a expressão de genes anti-apoptóticos, protegendo os leucócitos de um programa de morte celular (DUTTA *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2010b). Além disso, ativam a expressão de genes que produzem e estimulam mediadores pró-inflamatórios (LAWRENCE *et al.*, 2001). Sendo assim, é um importante fator na manutenção da resposta inflamatória, e sua diminuição, como demonstrado nesse trabalho, pode reduzir a resposta inflamatória, assim como deflagrar o programa de morte celular em leucócitos, antecipando o processo de resolução inflamatória. Esses achados corroboram com o trabalho de Lopes *et al.* (2011), onde foi demonstrado que a administração de H₂O₂ ou superóxido dismutase (SOD) em camundongos com artrite induzida por antígeno foi capaz de diminuir a inflamação devido ao aumento do número de neutrófilos apoptóticos e diminuição de NF- κ B, antecipando o processo de resolução.

Juntamente com a diminuição da translocação do NF- κ B para núcleo, foi observado que a Ang-(1-7) incubada com neutrófilos humanos, aumentam a taxa de apoptose dessas células, de forma semelhante aos resultados obtidos *in vivo*. Recentemente, Souza LL *et al.* (2012), demonstraram o papel anti-inflamatório, em nível celular, da Ang-(1-7), onde macrófagos peritoniais de camundongos estimulados com LPS, quando incubados com a Ang-(1-7), tinham os níveis de citocinas pró-inflamatórias atenuados, o que foi abolido com o agonista do receptor MAS, A779. Este trabalho corrobora com tais dados, mostrando que a Ang-(1-7) tem ações diretas em células de defesa. Vale ressaltar que ainda não foi descrito a presença do receptor MAS, especificamente em neutrófilos, o que torna ainda mais interessante tais achados.

O LPS é capaz de induzir a resposta inflamatória (KYO *et al.*, 2005; SOUZA; COSTA-NETO, 2012; VAGO *et al.*, 2012b). De modo interessante, a Ang-(1-7) foi capaz de antecipar a resolução da resposta inflamatória, aumentando a porcentagem de apoptose de

neutrófilos em um modelo de artrite induzida por LPS, indicando que sua ação não é só restrita ao modelo de artrite induzida por antígeno. Sendo assim, podemos inferir que a Ang-(1-7) pode funcionar também em outros modelos de inflamação, adiantando o processo resolutivo.

6 CONCLUSÕES

Nossos dados demonstram que o tratamento com a Angiotensina-(1-7) em modelos experimentais de artrite, foi capaz de antecipar a resolução da resposta inflamatória, por aumentar a taxa de apoptose de neutrófilos, mediado por caspases. Esse efeito foi também relacionado com a diminuição da fosforilação de p65, principal subunidade de NF- κ B. O estímulo a síntese endógena Ang-(1-7), através do tratamento com o ativador de ECA 2, DIZE, também foi capaz de induzir a resolução inflamatória. A Ang-(1-7) também foi capaz de induzir apoptose diretamente em neutrófilos humanos *in vitro* e diminuir a translocação de NF- κ B para o núcleo desses neutrófilos. Essa é a primeira observação de que a Ang-(1-7) promove a apoptose de neutrófilos *in vivo e in vitro*, e a primeira evidência de que o receptor Mas está presente em neutrófilos. Esses resultados reforçam a idéia de que a Angiotensina-(1-7) possa representar uma estratégia anti-inflamatória e pró-resolutiva eficaz para o tratamento de doenças nas quais o acúmulo e presença dos neutrófilos possa representar danos.

7 REFERÊNCIAS

- ABU NABAHAH, Y. N.; LOSADA, M.; ESTELLES, R.; MATEO, T.; COMPANY, C.; PIQUERAS, L.; LOPEZ-GINES, C.; SARAU, H.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E. J.; JOSE, P. J.; SANZ, M. J. CXCR2 blockade impairs angiotensin II-induced CC chemokine synthesis and mononuclear leukocyte infiltration. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 27, n. 11, p. 2370-2376, 2007
- AGARWAL, D.; ELKS, C. M.; REED, S. D.; MARIAPPAN, N.; MAJID, D. S.; FRANCIS, J. Chronic exercise preserves renal structure and hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid.Redox.Signal.*, v. 16, n. 2, p. 139-152, 2012
- ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun.Rev.*, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005
- AMARAL, F. A.; COSTA, V. V.; TAVARES, L. D.; SACHS, D.; COELHO, F. M.; FAGUNDES, C. T.; SORIANI, F. M.; SILVEIRA, T. N.; CUNHA, L. D.; ZAMBONI, D. S.; QUESNIAUX, V.; PERES, R. S.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; RYFFEL, B.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis Rheum.*, v. 64, n. 2, p. 474-484, 2012
- ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *J.Am.Soc.Nephrol.*, v. 10 Suppl 11, n. S30-S39, 1999
- ARIEL, A.; SERHAN, C. N. New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Front Immunol.*, v. 3, n. 4-2012
- BARROSO, L. C.; SILVEIRA, K. D.; LIMA, C. X.; BORGES, V.; BADER, M.; RACHID, M.; SANTOS, R. A.; SOUZA, D. G.; SIMOES E SILVA AC; TEIXEIRA, M. M. Renoprotective Effects of AVE0991, a Nonpeptide Mas Receptor Agonist, in Experimental Acute Renal Injury. *Int.J.Hypertens.*, v. 2012, n. 808726-2012
- BEST, S. M. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu.Rev.Microbiol.*, v. 62, n. 171-192, 2008

- BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J.Clin.Invest*, v. 118, n. 11, p. 3537-3545, 2008
- BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N.; STOCKINGER, B.; TAK, P. P. The resolution of inflammation. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 13, n. 1, p. 59-66, 2013
- BURG, N. D.; PILLINGER, M. H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin.Immunol.*, v. 99, n. 1, p. 7-17, 2001
- CAPETTINI, L. S.; MONTECUCCO, F.; MACH, F.; STERGIOPULOS, N.; SANTOS, R. A.; DA SILVA, R. F. Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. *Curr.Pharm.Des*, v. 18, n. 7, p. 963-970, 2012
- CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr.Rev.*, v. 24, n. 3, p. 261-271, 2003a
- CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr.Rev.*, v. 24, n. 3, p. 261-271, 2003b
- CASCAO, R.; ROSARIO, H. S.; SOUTO-CARNEIRO, M. M.; FONSECA, J. E. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun.Rev.*, v. 9, n. 8, p. 531-535, 2010a
- CASCAO, R.; ROSARIO, H. S.; SOUTO-CARNEIRO, M. M.; FONSECA, J. E. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun.Rev.*, v. 9, n. 8, p. 531-535, 2010b
- CHAN, M. M.; MOORE, A. R. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J.Immunol.*, v. 184, n. 11, p. 6418-6426, 2010
- CHAPPELL, M. C. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension*, v. 50, n. 4, p. 596-599, 2007
- COELHO, F. M.; PINHO, V.; AMARAL, F. A.; SACHS, D.; COSTA, V. V.; RODRIGUES, D. H.; VIEIRA, A. T.; SILVA, T. A.; SOUZA, D. G.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, A. L.; TEIXEIRA, M. M. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.*, v. 58, n. 8, p. 2329-2337, 2008a

- COELHO, F. M.; PINHO, V.; AMARAL, F. A.; SACHS, D.; COSTA, V. V.; RODRIGUES, D. H.; VIEIRA, A. T.; SILVA, T. A.; SOUZA, D. G.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, A. L.; TEIXEIRA, M. M. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.*, v. 58, n. 8, p. 2329-2337, 2008b
- COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.*, v. 326 (Pt 1), n. 1-16, 1997
- COMINI-FROTA, E. R.; RODRIGUES, D. H.; MIRANDA, E. C.; BRUM, D. G.; KAIMEN-MACIEL, D. R.; DONADI, E. A.; TEIXEIRA, A. L. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with the number of T2 MRI lesions in multiple sclerosis. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 45, n. 1, p. 68-71, 2012
- COSTA, A. C.; BECKER, L. K.; MORAES, E. R.; ROMERO, T. R.; GUZZO, L.; SANTOS, R. A.; DUARTE, I. D. Angiotensin-(1-7) induces peripheral antinociception through mas receptor activation in an opioid-independent pathway. *Pharmacology*, v. 89, n. 3-4, p. 137-144, 2012
- CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; FERREIRA, S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric.Oxide.*, v. 25, n. 3, p. 243-254, 2011
- DA SILVEIRA, K. D.; COELHO, F. M.; VIEIRA, A. T.; SACHS, D.; BARROSO, L. C.; COSTA, V. V.; BRETAS, T. L.; BADER, M.; DE SOUSA, L. P.; DA SILVA, T. A.; DOS SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA AC; TEIXEIRA, M. M. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J.Immunol.*, v. 185, n. 9, p. 5569-5576, 2010a
- DA SILVEIRA, K. D.; COELHO, F. M.; VIEIRA, A. T.; SACHS, D.; BARROSO, L. C.; COSTA, V. V.; BRETAS, T. L.; BADER, M.; DE SOUSA, L. P.; DA SILVA, T. A.; DOS SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA AC; TEIXEIRA, M. M. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J.Immunol.*, v. 185, n. 9, p. 5569-5576, 2010b
- DAMGAARD, R. B.; GYRD-HANSEN, M. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in regulation of inflammation and innate immunity. *Discov.Med.*, v. 11, n. 58, p. 221-231, 2011
- DINARELLO, C. A. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents*, v. 11, n. 3, p. 91-103, 1997

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ.Res.*, v. 87, n. 5, p. E1-E9, 2000a

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ.Res.*, v. 87, n. 5, p. E1-E9, 2000b

DUTTA, J.; FAN, Y.; GUPTA, N.; FAN, G.; GELINAS, C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*, v. 25, n. 51, p. 6800-6816, 2006

EL, Kebir D.; JOZSEF, L.; PAN, W.; FILEP, J. G. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ.Res.*, v. 103, n. 4, p. 352-359, 2008

EL-HASHIM, A. Z.; RENNO, W. M.; RAGHUPATHY, R.; ABDUO, H. T.; AKHTAR, S.; BENTER, I. F. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-kappaB-dependent pathways. *Br.J.Pharmacol.*, v. 166, n. 6, p. 1964-1976, 2012

ESENSTEN, J. H.; WOFSY, D.; BLUESTONE, J. A. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat.Rev.Rheumatol.*, v. 5, n. 10, p. 560-565, 2009

ESTEBAN, V.; HERINGER-WALTHER, S.; STERNER-KOCK, A.; DE, Bruin R.; VAN DEN ENGEL, S.; WANG, Y.; MEZZANO, S.; EGIDO, J.; SCHULTHEISS, H. P.; RUIZ-ORTEGA, M.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) and the G protein-coupled receptor MAS are key players in renal inflammation. *PLoS.One.*, v. 4, n. 4, p. e5406-2009

FERRARIO, C. M. The renin-angiotensin system: importance in physiology and pathology. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, v. 15 Suppl 3, n. S1-S5, 1990

FERRARIO, C. M.; CHAPPELL, M. C.; DEAN, R. H.; IYER, S. N. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J.Am.Soc.Nephrol.*, v. 9, n. 9, p. 1716-1722, 1998

- FERRARIO, C. M.; TRASK, A. J.; JESSUP, J. A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 289, n. 6, p. H2281-H2290, 2005
- FERREIRA, A. J.; CASTRO, C. H.; GUATIMOSIM, S.; ALMEIDA, P. W.; GOMES, E. R.; DIAS-PEIXOTO, M. F.; ALVES, M. N.; FAGUNDES-MOURA, C. R.; RENTZSCH, B.; GAVA, E.; ALMEIDA, A. P.; GUIMARAES, A. M.; KITTEN, G. T.; REUDELHUBER, T.; BADER, M.; SANTOS, R. A. Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther.Adv.Cardiovasc.Dis.*, v. 4, n. 2, p. 83-96, 2010
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 38, n. 4, p. 499-507, 2005
- FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 42, n. 2, p. 153-164, 2007
- FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 356-361, 2003
- FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev.Bras.Cir.Cardiovasc.*, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010
- FUJIHARA, S.; JAFFRAY, E.; FARROW, S. N.; ROSSI, A. G.; HASLETT, C.; HAY, R. T. Inhibition of NF-kappa B by a cell permeable form of I kappa B alpha induces apoptosis in eosinophils. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 326, n. 3, p. 632-637, 2005
- GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis*, v. 25, n. 11, p. 2045-2052, 2004
- GENG, J. G. Directional migration of leukocytes: their pathological roles in inflammation and strategies for development of anti-inflammatory therapies. *Cell Res.*, v. 11, n. 2, p. 85-88, 2001
- GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat.Rev.Drug Discov.*, v. 3, n. 5, p. 401-416, 2004

- GONZALEZ-GAY, M. A.; GONZALEZ-JUANATEY, C.; MARTIN, J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin.Arthritis Rheum.*, v. 35, n. 1, p. 8-17, 2005
- GRAVALLESE, E. M.; MANNING, C.; TSAY, A.; NAITO, A.; PAN, C.; AMENTO, E.; GOLDRING, S. R. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.*, v. 43, n. 2, p. 250-258, 2000
- GREENE, L. J.; SPADARO, A. C.; MARTINS, A. R.; PERUSSI DE JESUS, W. D.; CAMARGO, A. C. Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension*, v. 4, n. 2, p. 178-184, 1982
- GROBE, J. L.; MECCA, A. P.; LINGIS, M.; SHENOY, V.; BOLTON, T. A.; MACHADO, J. M.; SPETH, R. C.; RAIZADA, M. K.; KATOVICH, M. J. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 292, n. 2, p. H736-H742, 2007
- HALE, J. M.; MORIARTY, D. C. Pre-operative evaluation of the cervical spine in rheumatoid arthritis using dynamic magnetic resonance imaging. *Br.J.Anaesth.*, v. 86, n. 1, p. 148-149, 2001
- HALLERT, E.; HUSBERG, M.; JONSSON, D.; SKOGH, T. Rheumatoid arthritis is already expensive during the first year of the disease (the Swedish TIRA project). *Rheumatology.(Oxford)*, v. 43, n. 11, p. 1374-1382, 2004
- HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A. K.; SODERBERG-NAUCLER, C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu.Rev.Pathol.*, v. 1, n. 297-329, 2006
- IWATA, M.; COWLING, R. T.; GURANTZ, D.; MOORE, C.; ZHANG, S.; YUAN, J. X.; GREENBERG, B. H. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 289, n. 6, p. H2356-H2363, 2005
- JASIN, H. E. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J.Orthop.Sci.*, v. 5, n. 2, p. 178-181, 2000
- JONSSON, H.; ALLEN, P.; PENG, S. L. Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat.Med.*, v. 11, n. 6, p. 666-671, 2005
- KLARESKOG, L.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr.Opin.Rheumatol.*, v. 19, n. 1, p. 49-54, 2007

- KYO, F.; FUTANI, H.; MATSUI, K.; TERADA, M.; ADACHI, K.; NAGATA, K.; SANO, H.; TATEISHI, H.; TSUTSUI, H.; NAKANISHI, K. Endogenous interleukin-6, but not tumor necrosis factor alpha, contributes to the development of toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88-mediated acute arthritis in mice. *Arthritis Rheum.*, v. 52, n. 8, p. 2530-2540, 2005
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R.; WILLOUGHBY, D. A. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat.Med.*, v. 7, n. 12, p. 1291-1297, 2001
- LOOT, A. E.; ROKS, A. J.; HENNING, R. H.; TIO, R. A.; SUURMEIJER, A. J.; BOOMSMA, F.; VAN GILST, W. H. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*, v. 105, n. 13, p. 1548-1550, 2002
- LOPES, F.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; VIEIRA, E. L.; SOUSA, L. P.; SILVA, T. A.; VIEIRA, L. Q.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 63, n. 9, p. 2651-2660, 2011a
- LOPES, F.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; VIEIRA, E. L.; SOUSA, L. P.; SILVA, T. A.; VIEIRA, L. Q.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 63, n. 9, p. 2651-2660, 2011b
- LUBBERTS, E.; KOENDERS, M. I.; VAN DEN BERG, W. B. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res.Ther.*, v. 7, n. 1, p. 29-37, 2005
- MARINISSEN, M. J.; GUTKIND, J. S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol.Sci.*, v. 22, n. 7, p. 368-376, 2001
- MARRERO, M. B.; BENCHERIF, M. Convergence of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-activated pathways for anti-apoptosis and anti-inflammation: central role for JAK2 activation of STAT3 and NF-kappaB. *Brain Res.*, v. 1256, n. 1-7, 2009
- MARTEL-PELLETIER, J.; MCCOLLUM, R.; FUJIMOTO, N.; OBATA, K.; CLOUTIER, J. M.; PELLETIER, J. P. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest*, v. 70, n. 6, p. 807-815, 1994
- MCDUGALL, J. J. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Res.Ther.*, v. 8, n. 6, p. 220-2006

- MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 7, n. 6, p. 429-442, 2007
- MECCA, A. P.; REGENHARDT, R. W.; O'CONNOR, T. E.; JOSEPH, J. P.; RAIZADA, M. K.; KATOVICH, M. J.; SUMNERS, C. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Exp.Physiol.*, v. 96, n. 10, p. 1084-1096, 2011
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010
- MERCURE, C.; YOGI, A.; CALLERA, G. E.; ARANHA, A. B.; BADER, M.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; WALTHER, T.; TOUYZ, R. M.; REUDELHUBER, T. L. Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ.Res.*, v. 103, n. 11, p. 1319-1326, 2008
- METHOT, D.; LAPOINTE, M. C.; TOUYZ, R. M.; YANG, X. P.; CARRETERO, O. A.; DESCHEPPER, C. F.; SCHIFFRIN, E. L.; THIBAUT, G.; REUDELHUBER, T. L. Tissue targeting of angiotensin peptides. *J.Biol.Chem.*, v. 272, n. 20, p. 12994-12999, 1997
- MILOT, E.; FILEP, J. G. Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *ScientificWorldJournal.*, v. 11, n. 1948-1962, 2011a
- MILOT, E.; FILEP, J. G. Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *ScientificWorldJournal.*, v. 11, n. 1948-1962, 2011b
- MINAUR, N. J.; JACOBY, R. K.; COSH, J. A.; TAYLOR, G.; RASKER, J. J. Outcome after 40 years with rheumatoid arthritis: a prospective study of function, disease activity, and mortality. *J.Rheumatol.Suppl.*, v. 69, n. 3-8, 2004
- NABAH, Y. N.; MATEO, T.; ESTELLES, R.; MATA, M.; ZAGORSKI, J.; SARAU, H.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E. J.; JOSE, P. J.; SANZ, M. J. Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation*, v. 110, n. 23, p. 3581-3586, 2004
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002
- NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010
- NEUMANN, E.; BARNUM, S. R.; TARNER, I. H.; ECHOLS, J.; FLECK, M.; JUDEX, M.; KULLMANN, F.; MOUNTZ, J. D.; SCHOLMERICH, J.; GAY, S.; MULLER-LADNER, U. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.*, v. 46, n. 4, p. 934-945, 2002

- NISHIMURA, H. Angiotensin receptors--evolutionary overview and perspectives. *Comp Biochem.Physiol A Mol Integr.Physiol*, v. 128, n. 1, p. 11-30, 2001
- NORLING, L. V.; SERHAN, C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J.Intern.Med.*, v. 268, n. 1, p. 15-24, 2010
- NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.*, v. 26, n. 3, p. 157-165, 2005
- PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. *Acta Trop.*, v. 54, n. 3-4, p. 185-203, 1993
- PEREIRA, R. M.; DOS SANTOS, R. A.; TEIXEIRA, M. M.; LEITE, V. H.; COSTA, L. P.; DA COSTA DIAS, F. L.; BARCELOS, L. S.; COLLARES, G. B.; SIMOES E SILVA AC. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J.Hepatol.*, v. 46, n. 4, p. 674-681, 2007
- PINHEIRO, S. V.; FERREIRA, A. J.; KITTEN, G. T.; DA SILVEIRA, K. D.; DA SILVA, D. A.; SANTOS, S. H.; GAVA, E.; CASTRO, C. H.; MAGALHAES, J. A.; DA MOTA, R. K.; BOTELHO-SANTOS, G. A.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA AC. Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int.*, v. 75, n. 11, p. 1184-1193, 2009
- PINHEIRO, S. V.; SIMOES E SILVA AC; SAMPAIO, W. O.; DE PAULA, R. D.; MENDES, E. P.; BONTEMPO, E. D.; PESQUERO, J. B.; WALTHER, T.; ALENINA, N.; BADER, M.; BLEICH, M.; SANTOS, R. A. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*, v. 44, n. 4, p. 490-496, 2004
- PINHO, V.; SOUZA, D. G.; BARSANTE, M. M.; HAMER, F. P.; DE FREITAS, M. S.; ROSSI, A. G.; TEIXEIRA, M. M. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J.Leukoc.Biol.*, v. 77, n. 5, p. 800-810, 2005
- POUBELLE, P. E.; CHAKRAVARTI, A.; FERNANDES, M. J.; DOIRON, K.; MARCEAU, A. A. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res.Ther.*, v. 9, n. 2, p. R25-2007
- PRINCE, L. R.; WHYTE, M. K.; SABROE, I.; PARKER, L. C. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr.Opin.Pharmacol.*, v. 11, n. 4, p. 397-403, 2011a

- PRINCE, L. R.; WHYTE, M. K.; SABROE, I.; PARKER, L. C. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr.Opin.Pharmacol.*, v. 11, n. 4, p. 397-403, 2011b
- ROSSI, A. G.; HALLETT, J. M.; SAWATZKY, D. A.; TEIXEIRA, M. M.; HASLETT, C. Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *Biochem.Soc.Trans.*, v. 35, n. Pt 2, p. 288-291, 2007
- RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; SUZUKI, Y.; RUPEREZ, M.; EGIDO, J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.*, v. 10, n. 3, p. 321-329, 2001
- RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C.; BARCELOS, L. S.; RACHID, M. A.; GUABIRABA, R.; ROFFE, E.; SOUZA, A. L.; SOUSA, L. P.; MIROLO, M.; DONI, A.; CASSALI, G. D.; PINHO, V.; LOCATI, M.; TEIXEIRA, M. M. Phosphoinositide 3-kinase gamma plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J.Leukoc.Biol.*, v. 89, n. 2, p. 269-282, 2011
- SANTIAGO, N. M.; GUIMARAES, P. S.; SIRVENTE, R. A.; OLIVEIRA, L. A.; IRIGOYEN, M. C.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Lifetime overproduction of circulating Angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension*, v. 55, n. 4, p. 889-896, 2010
- SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; NADU, A. P.; BRAGA, A. N.; DE ALMEIDA, A. P.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; BALATU, O.; ILIESCU, R.; REUDELHUBER, T. L.; BADER, M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics*, v. 17, n. 3, p. 292-299, 2004
- SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; SIMOES E SILVA AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp.Physiol*, v. 93, n. 5, p. 519-527, 2008
- SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA AC; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE, Buhr, I; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 2003a
- SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA AC; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE, Buhr, I; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.;

- MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 100, n. 14, p. 8258-8263, 2003b
- SANTOS, S. H.; FERNANDES, L. R.; MARIO, E. G.; FERREIRA, A. V.; PORTO, L. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; BOTION, L. M.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, v. 57, n. 2, p. 340-347, 2008
- SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 2, n. 12, p. 965-975, 2002
- SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, v. 407, n. 6805, p. 784-788, 2000
- SCHAIBLE, H. G.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G. S. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 966, n. 343-354, 2002
- SCHAIBLE, H. G.; GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, v. 55, n. 1, p. 5-54, 1993
- SCHULZE-KOOPS, H.; KALDEN, J. R. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.*, v. 15, n. 5, p. 677-691, 2001
- SERHAN, C. N. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *FASEB J.*, v. 25, n. 5, p. 1441-1448, 2011
- SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L. A.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.*, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2007
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 8, n. 5, p. 349-361, 2008
- SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat.Immunol.*, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best.Pract.Res.Clin.Anaesthesiol.*, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004

- SHIOZAWA, S.; SHIOZAWA, K.; FUJITA, T. Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus. *Arthritis Rheum.*, v. 26, n. 4, p. 472-478, 1983
- SIMOES E SILVA AC; DINIZ, J. S.; REGUEIRA, Filho A.; SANTOS, R. A. The renin angiotensin system in childhood hypertension: selective increase of angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *J.Pediatr.*, v. 145, n. 1, p. 93-98, 2004
- SIMOES E SILVA AC; PINHEIRO, S. V.; PEREIRA, R. M.; FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator. *Mini.Rev.Med.Chem.*, v. 6, n. 5, p. 603-609, 2006
- SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu.Rev.Biomed.Eng.*, v. 7, n. 151-185, 2005
- SNOW, M. H.; MIKULS, T. R. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease: the role of systemic inflammation and evolving strategies of prevention. *Curr.Opin.Rheumatol.*, v. 17, n. 3, p. 234-241, 2005
- SOUSA, L. P.; LOPES, F.; SILVA, D. M.; TAVARES, L. P.; VIEIRA, A. T.; REZENDE, B. M.; CARMO, A. F.; RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C.; BONJARDIM, C. A.; ALESSANDRI, A. L.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *J.Leukoc.Biol.*, v. 87, n. 5, p. 895-904, 2010a
- SOUSA, L. P.; LOPES, F.; SILVA, D. M.; TAVARES, L. P.; VIEIRA, A. T.; REZENDE, B. M.; CARMO, A. F.; RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C.; BONJARDIM, C. A.; ALESSANDRI, A. L.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *J.Leukoc.Biol.*, v. 87, n. 5, p. 895-904, 2010b
- SOUZA, D. G.; BERTINI, R.; VIEIRA, A. T.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; ALLEGRETTI, M.; COLOTTA, F.; TEIXEIRA, M. M. Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br.J.Pharmacol.*, v. 143, n. 1, p. 132-142, 2004
- SOUZA, L. L.; COSTA-NETO, C. M. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *J.Cell Physiol*, v. 227, n. 5, p. 2117-2122, 2012
- SUKUMARAN, V.; VEERAVEEDU, P. T.; GURUSAMY, N.; LAKSHMANAN, A. P.; YAMAGUCHI, K.; MA, M.; SUZUKI, K.; KODAMA, M.; WATANABE, K. Telmisartan

acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sci.*, v. 90, n. 7-8, p. 289-300, 2012

SUKUMARAN, V.; VEERAVEEDU, P. T.; GURUSAMY, N.; YAMAGUCHI, K.; LAKSHMANAN, A. P.; MA, M.; SUZUKI, K.; KODAMA, M.; WATANABE, K.

Cardioprotective effects of telmisartan against heart failure in rats induced by experimental autoimmune myocarditis through the modulation of angiotensin-converting enzyme-2/angiotensin 1-7/mas receptor axis. *Int.J.Biol.Sci.*, v. 7, n. 8, p. 1077-1092, 2011

TAKEMURA, S.; KLIMIUK, P. A.; BRAUN, A.; GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J.Immunol.*, v. 167, n. 8, p. 4710-4718, 2001

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 289, n. 4, p. H1560-H1566, 2005

TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat.Rev.Mol Cell Biol.*, v. 4, n. 11, p. 897-901, 2003

TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J.Biol.Chem.*, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, 2000a

TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J.Biol.Chem.*, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, 2000b

VAGO, J. P.; NOGUEIRA, C. R.; TAVARES, L. P.; SORIANI, F. M.; LOPES, F.; RUSSO, R. C.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis.

J.Leukoc.Biol., v. 92, n. 2, p. 249-258, 2012a

VAGO, J. P.; NOGUEIRA, C. R.; TAVARES, L. P.; SORIANI, F. M.; LOPES, F.; RUSSO, R. C.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis.

J.Leukoc.Biol., v. 92, n. 2, p. 249-258, 2012b

VICKERS, C.; HALES, P.; KAUSHIK, V.; DICK, L.; GAVIN, J.; TANG, J.; GODBOUT, K.; PARSONS, T.; BARONAS, E.; HSIEH, F.; ACTON, S.; PATANE, M.; NICHOLS, A.;

- TUMMINO, P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J.Biol.Chem.*, v. 277, n. 17, p. 14838-14843, 2002
- WARD, C.; WALKER, A.; DRANSFIELD, I.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Regulation of granulocyte apoptosis by NF-kappaB. *Biochem.Soc.Trans.*, v. 32, n. Pt3, p. 465-467, 2004
- WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J.Med.*, v. 320, n. 6, p. 365-376, 1989
- WIPKE, B. T.; ALLEN, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J.Immunol.*, v. 167, n. 3, p. 1601-1608, 2001
- XU, P.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, v. 300, n. 4, p. R804-R817, 2011
- ZAMAN, M. A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat.Rev.Drug Discov.*, v. 1, n. 8, p. 621-636, 2002