

**LÍVIA CORRÊA BARROSO**

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA RESOLUÇÃO DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO**

**2017**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**LÍVIA CORRÊA BARROSO**

**EFEITO DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA RESOLUÇÃO DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO**

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

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.

Co-orientadora: Prof. Dra. Vanessa Pinho.

Belo Horizonte 2017

**“O primeiro gole do copo das ciências naturais te tornará um ateu. Mas, no fundo do copo, Deus  
estará esperando por ti.”**

**(Werner Heisenberg).**

Dedico esse trabalho a minha família.

Aos meus pais, os meus maiores exemplos de  
companheirismo, dedicação e amor.

A minha irmã, Milena.

A minha princesa Letícia.

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, pelas broncas e principalmente pela oportunidade ao longo desses 10 anos.

A minha co-orientadora, Vanessa Pinho. Muito obrigada por todo seu carinho e atenção. Obrigada pelas discussões científicas, por me nortear, entender e incentivar. Seu 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), indispensável para a realização desse trabalho. Ao professor Anderson José Ferreira, pela sua colaboração e por me ceder o Dize, ativador endógeno de ECA2. A professora Danielle pelas discussões e carinho. A Professora Landa pelos conselhos. Ao professor Flávio pela presença diária.

A Izabela pela amizade, companhia, ajuda nos experimentos e pelas conversas científicas.

As loiras lindas da minha vida, minhas comadres, conselheiras e amigas: Loira e Grazi (minha cota de bases), nem tenho como agradecer por todo companheirismo, amizade e amor.

As minha amigas, companheiras para todas as horas, Katia, Cris e Luciana.

A Giselle, aquisição importantíssima no final do doutorado.

Aos colegas do grande grupo de imunofarmacologia: Juliana, Rebeca, Rodrigo, Rosália (obrigada pelos experimentos de dor), Daiane, Vivian, Marina, Juliana Priscila, Bráulio, Aninha, Bruno, Flávia, Rafael (Elisão), Celso, Vivian, Ana Carol, Denise, Rayssa, Barbara Maximínio, Alesandra, Julia, Wallyson, Jessica, Ana, Luiz, Willian, Gabriel e Renata.

Aos queridos amigos do LAGI, que fizeram a rotina ser muito mais divertida. Eu sou “lagiana” de coração.

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

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

As agencias financiadoras, CNPQ, CAPES e FAPEMIG.

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. Obrigada por cuidarem de mim e da Letícia com tanto amor. A minha irmã Milena por me apoiar em todas as minhas decisões, me aconselhar e sempre me fazer buscar o caminho certo, nem tenho como agradecer por seu amor e amizade. Ao Léo, por toda paciência e amizade. Ao Vitor e Tales, meus afilhados/sobrinhos queridos. A minha filha Letícia, o maior amor do mundo, minha força, é por você que eu tento ser cada dia melhor. Ao Heraldo, pelo amor, paciência e carinho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A779	Antagonista do Receptor Mas da Angiotensina-(1-7)
AIA	Artrite Induzida por Antígeno
ANOVA	Análise de Variância
Ang	Angiotensina
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
AR	Artrite Reumatóide
AT <sub>1</sub>	Receptor angiotensinérgico do tipo 1
AT <sub>2</sub>	Receptor angiotensinérgico do tipo 2
AVE 0991	Agonista do Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)
BSA	Albumina Sérica Bovina
C57Bl/6	Linhagem de Camundongos
CEBIO	Cento de Bioterismo
CETEA	Cômite de Ética em Experimentação Animal
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CT	Controle
DIZE	Aceturato de Diminazeno
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
EPM	Erro Padrão da Média
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio/Água Oxigenada
HCl	Ácido Clorídrico

HE	Eosina e Hematoxilina
HETAB	Brometo de Hexadecil-trimetil-amônio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
i.d.	Intradérmica
IgG	Imunoglobulinas
i.p.	Intraperitoneal
LOS	Losartan
<i>M. butiricum</i>	<i>Micobacterium butiricum</i>
Mas	Receptor da Angiotensina-(1-7) acoplado à proteína G
Mas <sup>-/-</sup>	Camundongos com deleção genética do receptor Mas
Mas <sup>+/+</sup> / WT	Camundongos com presença do receptor Mas, tipo selvagem
mBSA	Albumina Bovina Metilada
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de Sódio
NFKβ	Fator de Transcrição Nuclear kapa B
PBS	Tampão Fosfato Salino
PGE2	Prostaglandina E2
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TT	Tratados
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Zvad-FMK	Inibidor de caspase

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
1.1	Artrite: Aspectos Gerais .....	14
1.2	Inflamação .....	16
1.3	Resolução da inflamação.....	19
1.4	Sistema Renina Angiotensina .....	25
1.5	Angiotensina-(1-7) .....	27
2	Justificativa.....	30
3	Objetivos .....	31
3.1	Objetivo Geral.....	31
3.2	Objetivos Específicos.....	31
4	Metodologia .....	32
4.1	Animais.....	32
4.2	Fármacos e Reagentes .....	32
4.3	Modelo de artrite inflamatória induzida por antígeno (AIA) .....	32
4.4	Protocolo de tratamento dos grupos experimentais.....	33
4.5	Tecidos e fluidos coletados .....	34
4.6	Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular.....	34
4.7	Contagem total dos leucócitos .....	35
4.8	Contagem diferencial dos leucócitos .....	35
4.9	Avaliação da apoptose de leucócitos.....	36
4.10	Quantificação indireta do acúmulo de neutrófilos: atividade da mieloperoxidase (MPO).....	36
4.11	Protocolo de purificação de neutrófilos de sangue periférico humano e cultura celular.....	37
4.12	Ensaio de Eferocitose <i>in vivo</i> .....	39
4.13	RT-PCR – Reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa .....	39

4.14	Citometria de fluxo .....	42
4.15	Técnica de Microscopia Confocal.....	43
4.16	Avaliação de hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata de camundongo .....	44
4.17	Análise Estatística .....	45
5	RESULTADOS .....	46
5.1	Angiotensina-(1-7) antecipa a resolução da resposta inflamatória.....	46
5.2	A ativação endógena de Angiotensina-(1-7) antecipa a resolução da inflamação.....	49
5.3	A779, antagonista do receptor Mas, bloqueia a ação pró-resolutiva de Ang-(1-7) e atrasa a resolução natural.....	51
5.4	Ang-(1-7) aumenta a eferocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos.....	54
5.5	Ang-(1-7) diminui a nocicepção .....	56
5.6	Ang-(1-7) induz apoptose em neutrófilos humanos .....	57
5.7	Ang-(1-7) diminui a fosforilação de NF- $\kappa$ B em neutrófilos .....	63
5.8	O tratamento sistêmico com o composto HP $\beta$ CD/Ang-(1-7) antecipa a resolução da resposta inflamatória.....	65
6	Discussão.....	67
7	Conclusão.....	74
8	REFERÊNCIAS.....	75
9	ANEXOS (Produção durante o doutorado) .....	88

TABELA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Migração dos leucócitos para o sítio inflamatório. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2 - Série orquestrada de eventos que ocorrem durante um processo inflamatório agudo culminando na resolução. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3 - Sistema Renina-Angiotensina. Principais peptídeos biologicamente ativos no SRA e principais ações da Angiotensina II e Angiotensina-(1-7). ....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4 - Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7) na resolução inflamatória em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 5 - Efeito da administração local de DIZE (ativador endógeno de ECA 2) na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 6 - Efeito do A779, antagonista do receptor MAS, na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 7 - Efeito do A779, antagonista do receptor MAS, na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 8 - Angiotensina-(1-7) aumenta a eferocitose. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 9 - Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7) na hipernocicepção, em um modelo de artrite induzida por antígeno. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 10 - Efeito da Angiotensina-(1-7) em cultura de neutrófilos humanos do sangue periférico. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 11 - Presença do receptor MAS em neutrófilos do sangue periférico humano. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 12 - Angiotensina-(1-7) diminui ativação de NF-kB. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 13 - Efeito da administração oral de angiotensina-(1-7) na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). ....</b>	<b>66</b>

## RESUMO

A resolução da inflamação é um evento crucial para prevenção de danos teciduais e consequente perda de função do órgão. Estudos recentes promoveram o melhor entendimento sobre o papel do sistema renina-angiotensina na patogênese de diversas doenças. Sabe-se que Angiotensina- (1-7) [Ang-(1-7)] tem um papel importante na proliferação celular, fibrose tecidual e inflamação. Nesse trabalho, foram obtidos fortes indícios de uma nova ação da Ang-(1-7): promover a resolução da inflamação em um modelo de artrite. Quando a Ang-(1-7) foi administrada por via oral ou diretamente no local da inflamação, no pico do processo inflamatório, o heptapeptídeo reduziu o acúmulo de neutrófilos na cavidade sinovial. Ang-(1-7) também promoveu a resolução da inflamação por induzir apoptose de neutrófilos. Esse efeito foi mediado pelo receptor Mas, dependente da ativação de caspase e inibição de NF- $\kappa$ B. Ang-(1-7) também aumentou a eferocitose de neutrófilos apoptóticos. Tomados em conjunto, esses dados mostram a participação da Ang-(1-7) na resolução da inflamação, indicando que a Ang-(1-7) não apenas inibe a resposta inflamatória, mas também contribui para uma resolução sem sequelas, o que nos leva a acreditar no seu papel como um novo mediador resolutivo.

## ABSTRACT

Resolution of inflammation is a crucial event that prevents tissue damage and the consequent loss of organ function. Recent studies have advanced our understanding on the role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of several diseases. We now recognize angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] as having pivotal role in antagonizing cell proliferation, tissue fibrosis and inflammation. Using experimental models of inflammation, we provide strong data for a novel action of Ang-(1-7): resolution of inflammation in arthritis. When administered orally or directly to the site of inflammation, at the peak of the inflammatory process, Ang-(1-7) decreased neutrophil accumulation in the synovial cavity. Ang-(1-7) promoted the resolution of inflammation by inducing apoptosis of neutrophils. These effects were Mas receptor-mediated and depended on the activation of caspase and inhibition of NF- $\kappa$ B. Ang-(1-7) also increased the engulfment of apoptotic leukocytes, ie. efferocytosis. Altogether, our results show that Ang-(1-7) activates events that are crucial for the resolution of the inflammatory process and the return to homeostasis indicating Ang-(1-7) as a novel endogenous pro-resolving mediator.

# 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 e a que causa maior incapacidade, afetando aproximadamente 1% da população adulta do mundo, acometendo com maior frequência mulheres. Na AR, a dor e perda de função são as principais causas de morbidade e são fatores limitantes para o trabalho e execução das atividades da vida diária (ALAMANOS; DROSOS, 2005; MINAUR *et al.*, 2004; VERSTAPPEN, 2015). A doença também está associada a uma taxa de mortalidade considerável, principalmente, em decorrência de eventos cardiovasculares (GONZALEZ-GAY; GONZALEZ-JUANATEY; MARTIN, 2005).

A AR é uma doença inflamatória poliarticular que afeta principalmente as pequenas articulações das mãos e pés (FIRESTEIN, 2003). Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos, fundamentais no desencadeamento e manutenção do processo inflamatório na AR, acumulam-se na cavidade e tecido sinoviais e liberam enzimas proteolíticas que causam a lesão tecidual (JASIN, 2000; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 1994; MCINNES; SCHETT, 2007; NEUMANN *et al.*, 2002). Clinicamente, a AR é considerada uma doença inflamatória crônica, na qual é observada inflamação da membrana sinovial com formação de *pannus* (crescimento exacerbado do tecido conjuntivo sobre a superfície articular), com invasão e destruição das estruturas articulares, incluindo o tecido ósseo (HALE; MORIARTY, 2001; ROBERTS; DICKINSON;

TAAMS, 2015). A cavidade sinovial, que em condições normais é uma região acelular delimitada por uma fina membrana conjuntiva, torna-se celularizada com espessamento da camada sinovial em decorrência do aumento do número dos sinoviócitos (MATSUO *et al.*, 2016). Além disso, esta região é preenchida por um infiltrado celular, contendo: neutrófilos, fibroblastos sinoviais, macrófagos, mastócitos, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, células natural killer (NK) e células B. Esse infiltrado sinovial pode invadir a cartilagem adjacente e promover a 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 que pode ser desencadeada por fatores ambientais e genéticos. Neste contexto, podem-se destacar as artrites associadas à auto-imunidade ou artrite reumatoide, nas quais observa-se a produção de anticorpos específicos, conhecidos como “*fatores reumatóides*” e alguns peptídeos contendo citrulina (Firestein, 2003). Nesse caso, existe a participação de linfócitos do tipo T *helper* 1 e 17 com a produção de citocinas e quimiocinas (ESENSTEN; WOFYSY; BLUESTONE, 2009; LUBBERTS; KOENDERS; VAN DEN BERG, 2005; SCHULZE-KOOPS; KALDEN, 2001). Na artrite autoimune, os linfócitos B são ativados e produzem autoanticorpos com conseqüente formação de complexos imunes (TAKEMURA *et al.*, 2001). Várias citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-18) também estão envolvidas no processo inflamatório e na lesão articular (BRENNAN; MCINNES, 2008; MCINNES; BUCKLEY; ISAACS, 2016; MCINNES; SCHETT, 2007). Além dos fatores genéticos e imunoinflamatórios, fatores ambientais também contribuem para a indução, intensidade e progressão da AR como, por exemplo, o tabagismo que promove a adição do aminoácido citrulina a proteínas do organismo, tornando-as antigênicas

(CATRINA *et al.*, 2016; KLARESKOG; PADYUKOV; ALFREDSSON, 2007; WOODWORTH; DEN BROEDER, 2015).

Os modelos experimentais auxiliam nos estudos tanto da patogênese das doenças, quanto da resposta inflamatória associada e de como podemos controlá-la, a fim de diminuir os danos causados pela inflamação.

Existem vários modelos experimentais de artrite, entre eles: artrite induzida por colágeno, artrite induzida por anticorpos de colágeno, a artrite séptica, artrite induzida por proteoglicanos, entre outros modelos. Em cada um desses modelos, o processo inflamatório articular é induzido de forma diferente e apresenta características próprias, com participação de determinados tipos celulares e diferentes graus de lesão tecidual e óssea (BESSIS *et al.*, 2017). O modelo de artrite induzida por antígeno tem sido amplamente utilizado na literatura (DA SILVEIRA *et al.*, 2010a; LOPES *et al.*, 2011a; SILVEIRA *et al.*, 2013b). A imunização é feita com adjuvante completo de Freund (CFA) e albumina de soro bovino metilada (mBSA), seguida de uma injeção intra-articular de mBSA, dias após a imunização. Células T CD4<sup>+</sup> fornecem o estímulo inflamatório inicial, levando ao recrutamento de neutrófilos e macrófagos, o que aumenta a inflamação e leva a hiperplasia da camada sinovial e perda da cartilagem articular (BESSIS *et al.*, 2017).

## **1.2 Inflamação**

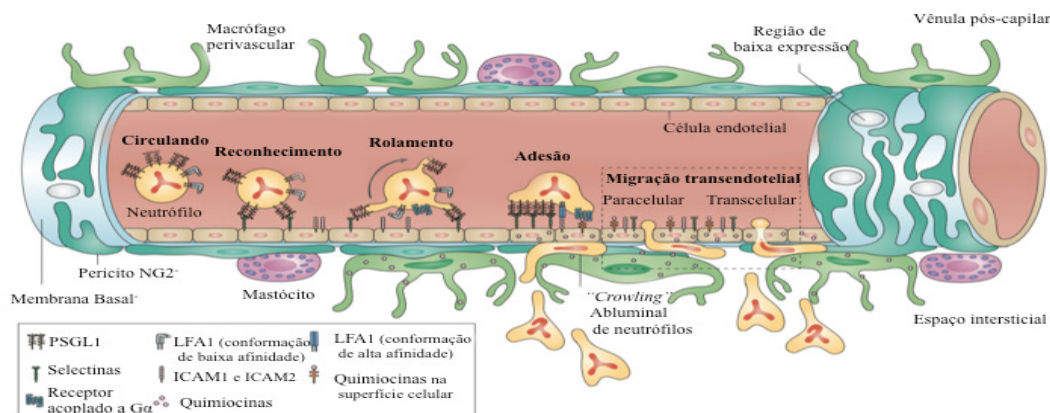
A resposta inflamatória pode ser caracterizada como um processo fisiológico, pelo qual os tecidos do corpo respondem a diferentes estímulos, sejam eles causados por agentes infecciosos, trauma, cirurgia, queimadura, infarto do tecido, câncer, entre outros, a fim de que a homeostase

tecidual seja restaurada (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 (NATHAN, 2002). A inflamação é um processo altamente regulado pelo organismo, que elimina o agente causador da resposta e desencadeia eventos de reparo ou regeneração. (BASIL; LEVY, 2016; FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Entretanto, a mesma resposta inflamatória que protege o organismo de agentes nocivos pode tornar-se prejudicial. A inflamação é, por exemplo, a base de várias doenças crônicas como aterosclerose, asma, esclerose múltipla, fibrose pulmonar e também dos diferentes tipos de artrite (COMINI-FROTA *et al.*, 2012; DA SILVEIRA *et al.*, 2010b; NATHAN; DING, 2010; RUSSO *et al.*, 2011).

Os sintomas clínicos da inflamação foram descritos no século I d.C., por Cornelius Celsus, e denominados como sinais cardinais da inflamação. São eles: o rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), tumor (edema, causado por aumento da permeabilidade da microvasculatura e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), calor (associado ao aumento do fluxo sanguíneo), e dor (em parte, devido a alterações nas terminações nervosas). Um quinto sinal foi descrito por Rudolf Virchow em 1858, que caracterizou a perda da função ou disfunção dos órgãos envolvidos, como resultado do edema e da dor (GAUTIER *et al.*, 2013).

O processo inflamatório pode apresentar duas reações principais: as reações vasculares e celulares, que são mediadas por diferentes moléculas, incluindo fatores quimiotáticos. A liberação de estímulos quimiotáticos resulta no recrutamento dos leucócitos e permite a interação de células circulantes com as células endoteliais, possibilitando o acúmulo dos leucócitos no sítio inflamatório (GILROY *et al.*, 2004). O processo de recrutamento dos leucócitos obedece aos

seguintes passos: captura, rolamento, adesão firme ao endotélio e transmigração endotelial (Figura 1). Quando chegam ao local da inflamação, os leucócitos produzem mediadores que contribuem para o início e manutenção da inflamação, o que pode resultar na cronificação da resposta inflamatória e maior lesão do tecido ou órgão afetado (CHEN *et al.*, 2002). Assim, é de grande interesse entender os mecanismos responsáveis pela manutenção e eliminação de leucócitos do sítio inflamatório.



**Figura 1 - Migração dos leucócitos para o sítio inflamatório.** Representação esquemática do extravasamento perivascular. Após a adesão firme em vênulas pós-capilares, os neutrófilos transmigram através da monocamada de células endoteliais. Após a migração transendotelial, os neutrófilos rastejam sobre os pericitos que são negativos para os proteoglicanos de sulfato de condroitina. Este rastejamento depende da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), antígeno-1 associado à função leucocitária (LFA1) e ICAM1. Os neutrófilos rastejam, após o extravasamento, em regiões de baixas densidades de proteínas da matriz extracelular na membrana basal (regiões de baixa expressão). Os macrófagos perivascularares podem auxiliar na formação dos "pontos quentes" no local da inflamação, devido à sua capacidade para produzir grandes quantidades de quimiocinas. Os mastócitos próximos à parede do vaso sanguíneo, também podem responder aos sinais de "perigo" com a liberação de fatores quimiotáticos. Fonte: Adaptado de Weninger et al., 2014

### 1.3 Resolução da inflamação

Inflamação prolongada é um evento comum em muitas doenças inflamatórias crônicas, incluindo doenças vasculares, síndrome metabólica, doenças neurológicas, e muitas outras, sendo

portanto, motivo de atenção para profissionais de saúde. Uma vez que a resposta inflamatória aguda permite a reparação de tecidos lesionados e eliminação dos organismos invasores, ela deve ser auto-limitada, levando à completa resolução, permitindo assim o retorno à homeostase. Dessa forma, o controle preciso entre inflamação e término da resposta inflamatória é determinante para a cronificação ou resolução da inflamação (SERHAN; CHIANG; DALLI, 2015). A figura 2 destaca, de forma esquemática, os processos de inflamação em direção à resolução da resposta inflamatória.

A resolução da resposta inflamatória foi considerada, por muito tempo, um processo passivo. No entanto, hoje sabe-se que ela é um processo complexo e ativamente controlado por eventos moleculares e celulares (SERHAN, 2011). Dentre esses eventos, podemos destacar a indução de apoptose do leucócito efetor, mudança de fenótipo de macrófagos, eferocitose, produção de mediadores pró-resolutivos lipídicos, como lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas, mediadores proteicos e mediadores gasosos. (DALLI; SERHAN, 2012; SERHAN; CHIANG; DALLI, 2015). Além disso, a vasodilatação e formação de edema contribuem para a redução das concentrações do estímulo pró-inflamatório. Os leucócitos recrutados eliminam o agente causador da inflamação, mediadores inflamatórios são desativados, são produzidas citocinas anti-inflamatórias e células efetoras são eliminadas do tecido por drenagem linfática ou apoptose (ALESSANDRI *et al.*, 2013; RAVICHANDRAN; LORENZ, 2007).

Se o hospedeiro não contem o agente agressor ou se ocorrerem falhas nos mecanismos pró-resolutivos, a inflamação pode permanecer, gerando lesão tecidual. De acordo com o grau da lesão, ocorrerá regeneração do tecido, ou caso haja um dano tecidual extenso, como ocorre nas inflamações crônicas, às células lesadas serão substituídas, ocorrendo deposição de colágeno e

cicatrização (fibrose), que pode levar à perda da função do órgão (GILROY *et al.*, 2004). A regulação da apoptose é um ponto crucial na resolução inflamatória, assim como a depuração de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, processo conhecido como eferocitose (DALLI; SERHAN, 2012; SERHAN; CHIANG; DALLI, 2015). No entanto, em diferentes contextos, a inibição ou aceleração da apoptose pode ter consequências patológicas, como em infecções pelo 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 microrganismos e aumenta a susceptibilidade à infecções. Entretanto, em outras doenças, tais como pneumonia bacteriana, 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, 2011; PEREZ *et al.*, 2014a).

A apoptose é definida como uma forma programada ou fisiológica de morte celular por mecanismo altamente controlado que não induz inflamação e tem características morfológicas e bioquímicas específicas. Durante a apoptose, a célula sofre encolhimento, retenção de organelas, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Em algumas linhagens celulares, também ocorre formação dos corpos apoptóticos (HO; SAVILLE; WANWIMOLRUK, 2001). Os primeiros sinais bioquímicos do processo apoptótico incluem a exposição de fosfatidilserina (PS, do acrônimo inglês *phosphatidylserine*) à superfície celular externa, atuando como um sinal de reconhecimento para a ativação fagocítica dos macrófagos, que resulta na eliminação das células apoptóticas (LAHORTE *et al.*, 2004). Outro importante marcador de apoptose é a ativação de

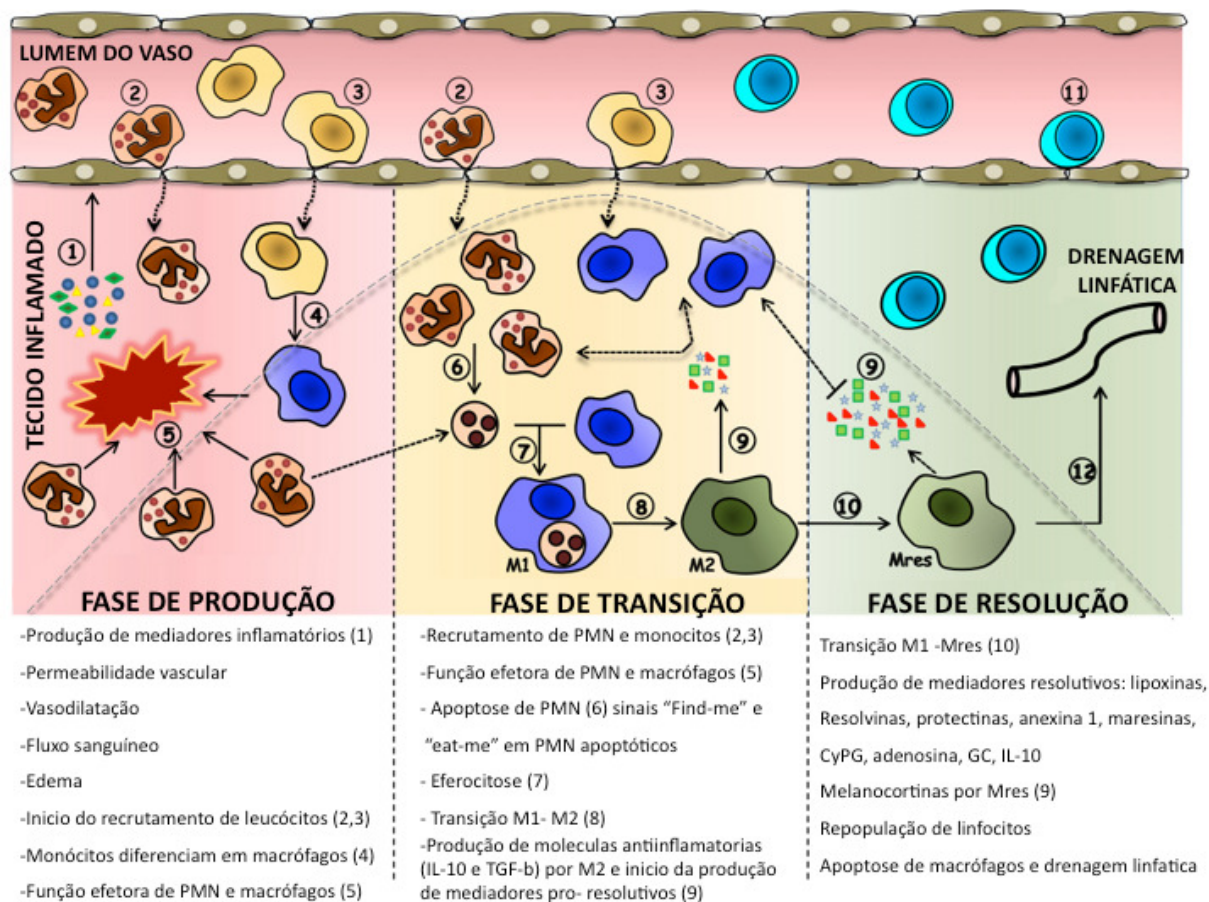
caspase-3, que é uma protease intracelular efetora desse processo, atuando na clivagem de estruturas celulares e promovendo a decomposição celular (NATHAN; DING, 2010).

Os macrófagos desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro, cicatrização, reparo e inflamação crônica (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005). São células fundamentais para a etiologia de uma série de doenças inflamatórias, incluindo a artrite reumatóide, arterosclerose e asma (BYSTROM *et al.*, 2011). Além disso, os macrófagos possuem diversas funções, bem como fenótipo diferenciado, de acordo com o ambiente inflamatório (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Assim, podem tornar-se classicamente ativados (M1) ou alternativamente ativados (M2). Macrófagos M1 adquirem um fenótipo pró-inflamatório com liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, e podem ser induzidos por estímulos microbianos ou citocinas (GORDON; MARTINEZ, 2010; LOCATI; MANTOVANI; SICA, 2013). Macrófagos M2 liberam mediadores pró resolutivos e secretam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que contribuem para a resolução da inflamação, tem capacidade bactericida diminuída e possuem alta capacidade eferocítica (ROSSOL *et al.*, 2011). Além dos macrófagos M1 e M2, um outro tipo de macrófago que pode ser identificado na fase resolutiva da inflamação é denominado macrófago resolutivo (Mres). O Mres é envolvido no aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos que, posteriormente, serão drenados pelos vasos linfáticos ou sofrerão apoptose para que ocorra a total resolução da resposta inflamatória (ORTEGA-GOMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013).

Outro evento essencial para o sucesso da resolução é a eferocitose de leucócitos apoptóticos. Eferocitose é o processo pelo qual as células apoptóticas têm seus corpúsculos apoptóticos removidos e degradados por células fagocíticas. As células mortas são removidas do

sítio inflamatório antes que a membrana celular seja degradada e seu conteúdo citoplasmático seja liberado. Isso previne a exposição do tecido a enzimas tóxicas e outros componentes intracelulares (LIANG *et al.*, 2014; POON; HULETT; PARISH, 2010). A eliminação de células apoptóticas é mediada, principalmente, por fagócitos profissionais, como macrófagos, mas fagócitos não profissionais também podem participar desse processo. Embora a eferocitose seja semelhante com a fagocitose trata-se de um processo distinto, mediado por receptores específicos, que sinalizam através de GTPases da família Rho, especificamente a RhoA (MARTIN; PETERS; BEHAR, 2014). Após a eferocitose, os macrófagos podem mudar seu perfil para M2, os quais produzem moléculas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ) e mediadores pró- resolutivos (lipoxinas, resolvinas E e D, maresinas e protectinas, que são derivadas de ácidos graxos) que impedem o recrutamento de novos leucócitos, induzem apoptose de leucócitos infiltrados e o recrutamento de novos monócitos, que contribuirão para o processo de eferocitose. Os macrófagos M2 participam da reconstituição de tecidos e têm um papel importante no retorno da homeostase tecidual (MADERNA *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2008).

A resolução da resposta inflamatória é um processo muito importante para manter o equilíbrio do organismo, de modo, que entender seu funcionamento, assim como estudar novos mediadores e fármacos que interfiram nesse processo é de suma importância.



**Figura 2 - Série orquestrada de eventos que ocorrem durante um processo inflamatório agudo culminando na resolução.** A lesão tecidual (infecção estéril ou infecciosa) leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou PAMPs) pelas células residentes (macrófagos teciduais, células dendríticas e células epiteliais), os quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios (1). Nesta fase produtiva da inflamação, mediadores atuam promovendo vasodilatação e consequente aumento do fluxo sanguíneo local, modificando a permeabilidade do endotélio. Estes eventos são acompanhados por hiperemia e exsudação de proteínas plasmáticas e de líquidos (edema). As células endoteliais também são ativadas e expressam moléculas de adesão celular (selectinas e integrinas) e apresentam mediadores quimioatrativos, que permitem a captura e extravasamento de leucócitos (2-4). Leucócitos polimorfonucleares (sobretudo neutrófilos) são as primeiras células que extravasam para os tecidos inflamados (2), seguidos por células mononucleares (3). Com a progressão da resposta inflamatória, há intenso influxo de leucócitos para o tecido inflamado. Estas células podem ser ativadas e se tornarem fonte importante de uma variedade de mediadores, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio (ROS) (5), o que permitirá que os leucócitos exerçam suas funções efetoras nos tecidos. Na fase de transição da inflamação, apesar do intenso acúmulo de leucócitos PMNs, sob a ação de sinais pró-resolutivos (mediada por mediadores pró-resolutivos e diminuição dos níveis de agentes modificadores da sobrevivência celular), inicia-se a apoptose (6), seguido de fagocitose por macrófagos teciduais (eferocitose) (7). Este processo inclui vários sinais que levam à atração, a

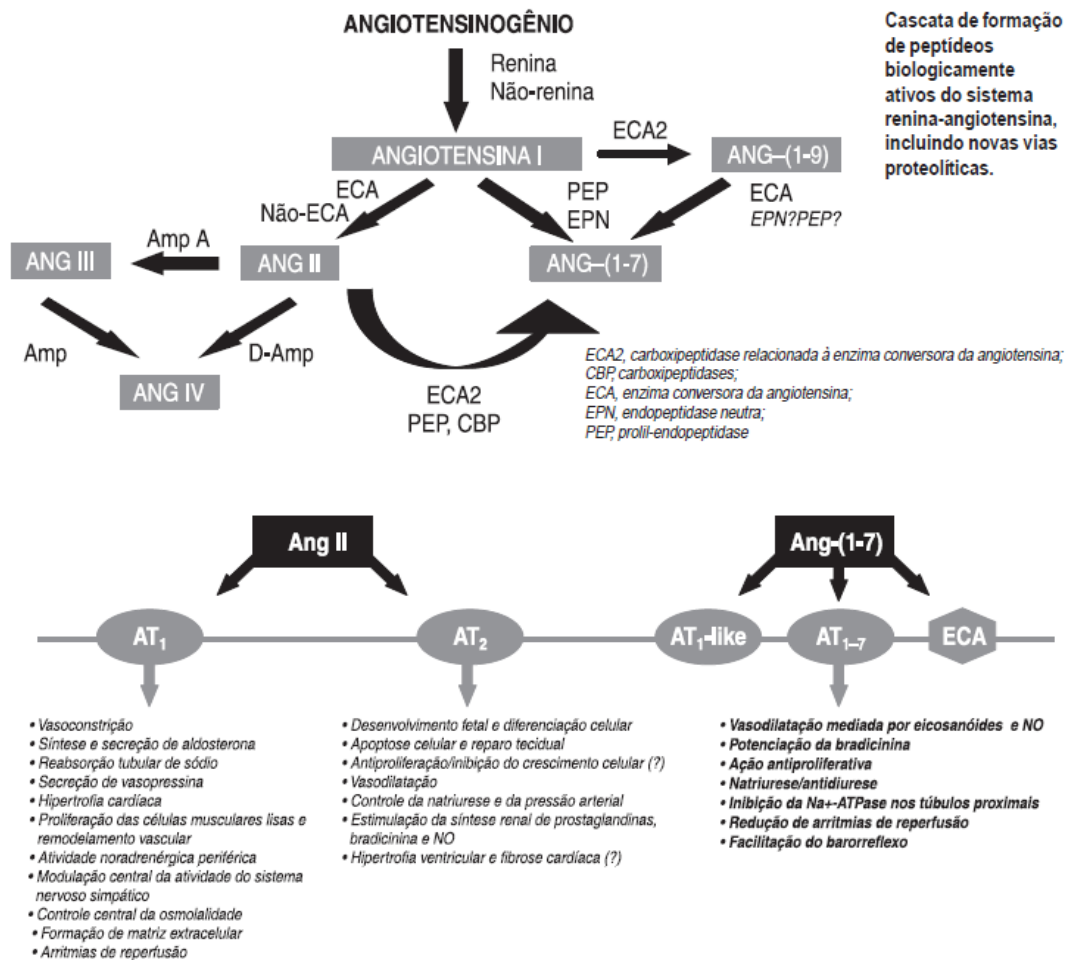
ligação e a remoção de células apoptóticas por macrófagos. Durante a eferocitose, macrófagos mudam seu fenótipo de M1 para M2 (8). Macrófagos M2 - (ou M2 like) são altamente eferocíticos e produzem moléculas anti-inflamatórias (tais como IL-10 e TGF- $\beta$ ) e mediadores pró-resolutivos (9). Tais mediadores têm o potencial para inibir o recrutamento adicional de PMN, intensificar a migração de monócitos e amplificar a eferocitose. Macrófagos M2 se modificam para macrófagos resolutivos (Mres) (10), os quais apresentam capacidade fagocítica reduzida, mas, no entanto, produzem proteínas anti-fibróticas e antioxidantes que limitam o dano tecidual e fibrose. Tais eventos contribuem para a fase de resolução da inflamação. O aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, de mediadores pró-resolutivos e anti-fibróticos por macrófagos resolutivos (Mres), a repovoação por linfócitos (11) e apoptose de macrófagos ou drenagem destas células para o linfonodo local (12) encerram o processo inflamatório e restauram a homeostase do tecido. Fonte: Adaptado de Alessandri et al., 2013.

#### **1.4 Sistema Renina Angiotensina**

O sistema renina-angiotensina (SRA) é classicamente conceituado como um sistema que exerce funções cardiovasculares, renais e adrenais (ZAMAN; OPARIL; CALHOUN, 2002). A ativação desse sistema inclui várias interações enzima-substrato que resultam na produção de vários peptídeos biologicamente ativos (ARDAILLOU, 1999; FERRARIO *et al.*, 1998; FERRARIO *et al.*, 2002; NISHIMURA, 2001). A angiotensina II (Ang II) é o principal peptídeo biologicamente ativo do SRA. A renina, uma protease liberada pelo aparelho justaglomerular do rim, 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). A Ang II exerce grande parte de seus efeitos biológicos por meio da ativação do receptor AT<sub>1</sub>. Dentre os efeitos destacam-se: vasoconstrição, hipertrofia celular, fibrose, formação de radicais de superóxido, ativação do sistema nervoso simpático e indução da secreção de endotelina e aldosterona (CAREY; SIRAGY, 2003; CHAPPELL, 2016). A Ang II também pode-se ligar ao receptor AT<sub>2</sub> produzindo efeitos opostos aos mediados pelo

receptor AT1 (FERRARIO; TRASK; JESSUP, 2005; SANTOS; FERREIRA; SIMOES E SILVA AC, 2008; SANTOS *et al.*, 2008).

As ações do SRA eram anteriormente atribuídas exclusivamente a angiotensina II. No entanto, nas últimas décadas, a descoberta de efeitos biológicos de outros peptídeos angiotensinérgicos, novos receptores, novas enzimas, rotas metabólicas e vias de sinalização modificaram o conhecimento sobre esse sistema (PINHEIRO *et al.*, 2009; SANTOS; FERREIRA; SIMOES E SILVA AC, 2008). Em 1988, foi descoberto um outro peptídeo biologicamente ativo que exerce efeitos opostos aos mediados pela Ang II, a Angiotensina-(1-7)(SANTOS *et al.*, 1988). Este peptídeo foi considerado, por muito tempo, como um metabólito inativo, mas esse conceito começou a mudar com estudos de SCHIAVONE *et al.* (1988), que demonstrou o papel da Ang-(1-7) em estimular a liberação de vasopressina pelo hipotálamo. Desde então, inúmeros estudos têm contribuído para modificar a visão sobre SRA e de suas funções no hipotálamo, no coração, na hipertensão, entre outros (CHAPPELL, 2007; FERREIRA; SANTOS, 2005; SANTOS; FERREIRA; SIMOES E SILVA AC, 2008; SCHIAVONE *et al.*, 1988; SIMOES E SILVA AC *et al.*, 2006; SIMOES E SILVA AC; TEIXEIRA, 2016). A figura 3 fornece uma visão geral sobre o SRA.



**Figura 3 - Sistema Renina-Angiotensina. Principais peptídeos biologicamente ativos no SRA e principais ações da Angiotensina II e Angiotensina-(1-7).** Adaptada: SANTOS & SAMPAIO, 2002.

### 1.5 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; DONOGHUE *et al.*, 2000b; TIPNIS *et al.*, 2000a) e a descoberta de um novo receptor, acoplado a proteína G, o receptor Mas, ao qual a Ang-(1-7) se liga e exerce

seus principais efeitos (SANTOS *et al.*, 2003a). Ang-(1-7) é produzida, principalmente, por meio da ação de ECA2, que tem cerca de 400 vezes menos afinidade para Ang I do que a Ang II. A Ang II é o substrato principal para síntese de Ang-(1-7) (DONOGHUE *et al.*, 2000b; FERRARIO, 1990; VICKERS *et al.*, 2002). ECA2 pode também formar Ang-(1-7), com menos eficiência, por meio da hidrólise de Ang I em Ang-(1-9), com a subsequente formação de Ang-(1-7) (VICKERS *et al.*, 2002). Esse peptídeo exerce as suas funções, principalmente, através da ativação do receptor de sete domínios transmembrânicos acoplados a proteína G, denominado receptor Mas (receptor AT1-7) (SANTOS *et al.*, 2003b; SIMOES E SILVA AC *et al.*, 2004). 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.*, 2003c), tais como: vasodilatação (LOOT *et al.*, 2002), efeito anti-arritmogênico (SANTOS *et al.*, 2004), efeito anti-fibrótico (PEREIRA *et al.*, 2007), ação anti-proliferativa no pulmão e coração, entre outros (GALLAGHER; TALLANT, 2004; TALLANT; FERRARIO; GALLAGHER, 2005). Diante dos resultados, a visão atual do SRA inclui 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 AT<sub>1</sub>; e o eixo contra-regulatório, que é formado pela enzima homóloga da ECA, denominada ECA2, Ang-(1-7) e o receptor Mas.

Estudos demonstraram que a Ang-(1-7) é um peptídeo com atividade biológica em vários órgãos, cuja presença e ações são bastante relevantes, como, por exemplo, na proteção contra AVC cerebral em ratos com hipertensão (PINHEIRO *et al.*, 2004; REGENHARDT *et al.*, 2014), a proteção contra lesão pulmonar na asma (MAGALHAES *et al.*, 2015), entre outras. Entretanto, há muito a ser pesquisado sobre seu efeito nos processos inflamatórios.

A Ang-(1-7) pode apresentar efeitos anti-inflamatórios associado à diminuição do recrutamento de neutrófilos e dano tecidual, como já demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa em um modelo de artrite induzida por antígeno, (DA SILVEIRA *et al.*, 2010b), no modelo de glomeronefrite induzida por adriamicina (SILVEIRA *et al.*, 2013a) e no modelo de insuficiência renal aguda induzida por isquemia e reperfusão. O tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE 0991, foi capaz de diminuir o recrutamento de neutrófilos com consequente diminuição do dano tecidual (BARROSO *et al.*, 2012a).

Uma vez que Ang-(1-7) apresenta efeitos anti-inflamatórios em diferentes modelos de doenças inflamatórias e a ativação de seu receptor está associada à diminuição do recrutamento de neutrófilos, citocinas inflamatórias e melhora da lesão tecidual, pode-se hipotetizar se a Ang-(1-7) teria um papel na resolução da resposta inflamatória, levando não só a diminuição do recrutamento celular, mas também influenciando na apoptose de neutrófilos e nos processos de eferocitose.

## **2 JUSTIFICATIVA**

O processo inflamatório é de extrema importância na defesa do organismo contra infecções e lesões. No entanto, a inflamação descontrolada pode levar a dano tecidual, doenças crônicas, fibrose e doenças autoimunes. Atualmente, estudos na área de inflamação propõem entender melhor o processo da resolução da resposta inflamatória, visando utilizar estratégias terapêuticas baseadas no adiantamento do processo de resolução e o retorno a homeostase do tecido afetado, o que implica em menores danos teciduais. Demonstramos anteriormente que a Angiotensina-(1-7) tem uma função anti-inflamatória em vários modelos experimentais. No entanto, não é conhecida sua função na resolução da inflamação. Desta forma, esse estudo tem como proposta avaliar a ação da Ang-(1-7) na resolução da resposta inflamatória associada à um modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar os efeitos e potenciais mecanismos da ação da angiotensina-(1-7) na resolução da resposta inflamatória.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar se a angiotensina-(1-7) antecipa a resolução da resposta inflamatória, aumentando a apoptose de neutrófilos na cavidade articular;
- Verificar se a produção endógena de angiotensina-(1-7) participa da resolução da resposta inflamatória;
- Avaliar se o bloqueio do receptor Mas inibe os efeitos da angiotensina-(1-7);
- Verificar se a Angiotensina-(1-7) aumenta a eferocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos;
- Avaliar o efeito da Ang-(1-7) na hipernocicepção induzida pela AIA;
- Avaliar a ação da Angiotensina-(1-7) na sobrevivência de neutrófilos humanos;
- Avaliar se a Angiotensina-(1-7) diminui a fosforilação de NF- $\kappa$ B em neutrófilos;
- Avaliar se o composto oral da Ang-(1-7) (sistêmica) teria o mesmo efeito da Ang-(1-7) pura (oral).

## **4 METODOLOGIA**

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA), sob o protocolo de pesquisa número 192/2012 e pelo comitê de ética em pesquisa (COEP), sob o número de protocolo 0319.0.203.000-11.

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57Bl/6J, 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 (ICB/UFMG). Todos os animais foram mantidos no ciclo claro-escuro de 10-12 horas, com livre acesso a água e ração.

### **4.2 Fármacos e Reagentes**

Cetamina (Vetbrands, Brasil), Cloridrato de xilazina (Agener União, Brasil), Albumina de soro bovino metilada (mBSA), Albumina de soro bovino (BSA) e inibidor de caspase (ZVAD-FMK) foram adquiridos do laboratório Sigma (St. Louis, MO). Angiotensina-(1-7) incluída em ciclodextrina, HP $\beta$ CD/Ang-(1-7), e o antagonista de Ang-(1-7), o A779, foram doados 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.

### **4.3 Modelo de artrite inflamatória induzida por antígeno (AIA)**

O 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 Freud (COELHO *et al.*, 2008). Todos os animais foram anestesiados com solução de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), diluído em PBS estéril para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos. Camundongos C57Bl/6J 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 mBSA (10µg mBSA em 10 µL solução salina estéril) foi realizado 14 dias após a imunização, sendo que cada animal recebeu uma injeção na articulação fêmur-tibial traseira. 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 5 µl) e tecidos periarticulares removidos para avaliação da atividade de MPO (mieloperoxidase).

#### **4.4 Protocolo de tratamento dos grupos experimentais**

Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos:

**Controle:** camundongos imunizados com emulsão de CFA+ mBSA, desafiados com PBS 1X intra-articularmente (10 µl) e tratados com PBS 1X, 12 horas após o desafio. Tratamento administrado por via intra-articular.

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

**Tratado:** camundongos imunizados com emulsão de CFA + mBSA, desafiados com mBSA(10 µg em 10 µl de PBS) intra-articularmente e tratados com angiotensina-(1-7) ou DIZE (1 µg/kg),

12 horas após o desafio. O tratamento foi administrado por via intra-articular . O inibidor de caspase, ZVAD-FMK, foi administrado por via intraperitoneal 15 minutos antes do tratamento com a angiotensina-(1-7).

#### **4.5 Tecidos e fluidos coletados**

- Lavado articular: foi coletado da articulação fêmur-tibial em solução de BSA 3%, para 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.

#### **Parâmetros avaliados:**

- acúmulo de neutrófilos do tecido periarticular;
- contagem total e diferencial das células inflamatórias do lavado articular;
- contagem de neutrófilos com morfologia apoptótica do lavado articular;
- avaliação do fator de transcrição NF-kB por imunofluorescência no lavado articular.

#### **4.6 Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular**

Após 24h do desafio, os camundongos foram eutanaziados com uma mistura de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Para avaliar a migração de leucócitos (neutrófilos) para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular. Este procedimento consistiu em injetar 10 µL 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  $\mu\text{L}$  de albumina bovina 3% para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

#### **4.7 Contagem total dos leucócitos**

Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do lavado articular foram diluídas em 40  $\mu\text{L}$  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.

#### **4.8 Contagem diferencial dos leucócitos**

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 80  $\mu\text{L}$  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 1.000 x), usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos  $\times 10^4$ / cavidade articular.

#### **4.9 Avaliação da apoptose de leucócitos**

A apoptose foi avaliada como descrito por (PINHO *et al.*, 2005). Resumidamente: as células ( $5 \times 10^4$ ) retiradas 24 horas após o desafio com antígeno 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. Os neutrófilos apoptóticos apresentam mudanças de tamanho e fragmentação do núcleo.

#### **4.10 Quantificação indireta do acúmulo de neutrófilos: atividade da mieloperoxidase (MPO)**

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 (RUSSO *et al.*, 2009). 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 para quantificação de citocinas. O componente residual (sedimento) foi ressuspensionado em tampão 1 (NaCl 0,1 M,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,02 M,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,015 M – pH 4,7) na proporção de 1,9 mL para cada 100 mg 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

( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  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.

Ensaio bioquímico:

As amostras do tecido periarticular foram diluídas (1:3). Em seguida, as amostras foram adicionadas à placa de 96 poços (25  $\mu\text{l}$ /poço). Tetramethylbenzine (TMB - 1.6 mM em dimetilsulfóxido) foi adicionado à cada poço 25  $\mu\text{l}$ /poço e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Foi adicionado 100  $\mu\text{l}$ /poço de água oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$  -0,002%) e novamente a placa foi incubada a 37°C durante 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{l}$  ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  - 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.

#### **4.11 Protocolo de purificação de neutrófilos de sangue periférico humano e cultura celular.**

Doadores voluntários, de ambos os sexos, doaram aproximadamente 20 ml de sangue para a separação dos neutrófilos do sangue periférico por gradiente de densidade após centrifugação com histopaque. Ao sangue doado foi adicionado o mesmo volume de meio RPMI. Em um tudo

Falcon de 15 ml foi adicionado 3 ml 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, 6 ml 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 tubos Falcon de 50 ml, e adicionados meio RPMI até completar o volume total. O homogenato foi submetido a nova centrifugação a 1.300 rpm, por 15 minutos, a 24°C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento adicionado 1 ml de meio RPMI, 18 ml de água gelada e 2 ml de PBS 10X. O homogenato foi novamente centrifugado (1.300rpm,15minutos 24°C), o sobrenadante descartado e, ao pellet, adicionado 1 ml de meio RPMI, para contagem do número de neutrófilos. Alíquotas de 10 µL 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,  $1 \times 10^6$  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, diluídas em meio RPMI.

#### **4.12 Ensaio de Eferocitose *in vivo***

Esse protocolo é uma adaptação dos protocolos utilizados por Newson *et al.* 2014 e Dalli *et al.* 2012 (DALLI; SERHAN, 2012; NEWSON *et al.*, 2014). Os camundongos receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de zimosan (Sigma Chemical, St. Louis, MO) na dosagem de 1 mg/animal. Após 72h, os animais receberam  $2 \times 10^6$  neutrófilos humanos apoptóticos i.p. Trinta minutos antes da administração de neutrófilos apoptóticos, os animais receberam via i.p o tratamento com a Angiotensina-(1-7), no grupo controle somente PBS foi injetado. A apoptose foi estimulada pela incubação dos neutrófilos humanos com estaurosporina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) na concentração de 10 mM por poço durante 1 hora, foi adicionado  $5 \times 10^6$  células por poço. Uma hora e meia após a injeção neutrófilos apoptóticos os animais foram eutanasiados e o lavado peritoneal foi recolhido com 4 mL de PBS com pipeta Pasteur. As células foram preparadas para análise em lâminas preparadas em citocentrífuga, fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa e contadas (500 células por lâmina), utilizando microscópio ótico para determinar a porcentagem de células com morfologia eferocítica (células mononucleadas com corpos apoptóticos em seu citoplasma).

#### **4.13 RT-PCR – Reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa**

##### **Extração do RNA**

As amostras (neutrófilos de sangue periférico humano,  $1 \times 10^6$ ), 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 outro microtubo. 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 x 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.

### **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 2µl da amostra pura. O aparelho fornece a concentração em ng/µL e a correlação 260/280 (RNA/proteínas).

### **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 foram adicionado 50µM 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 14,5µl contendo 1,5µl de dNTPs a 100 mM (Promega Cor., Madison, WI, EUA), 4 µl tampão M-MLV 5X (Promega Cor., Madison WI, EUA), 200 U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 8,5µl 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.

### **PCR específica**

Para as reações subsequentes 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:

- Para receptor MAS humano:

*primer* senso- 5'- TTCCGGATGAGAAGAAATCC - 3',

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

- GAPDH:

*primer* senso 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3',

*primer* anti-senso 5'-GAGGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'.

#### **4.14 Citometria de fluxo**

Para caracterizar os neutrófilos apoptóticos utilizamos a técnica de citometria de fluxo (aparelho Becton Dickenson FACScan). As células recuperadas da cultura foram plaqueadas (em placa de fundo em “U”, 96 wells ou em eppendorfs de 1,5 mL) aproximadamente 200.000 células/well. Os anticorpos para marcação de superfície , os controles negativos (isotipos IgG1 e IgG2a), diluídos na solução de diluição de anticorpos, foram adicionados nas concentrações previamente

padronizadas, na quantidade 20 µl/well ou eppendorf e incubados por 30 minutos, 4°C sobre abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se 150 µl/well de wash B gelado e as células foram centrifugadas. Posteriormente, foi adicionado 190 µl de “binding buffer, 5 µl de anexina-V marcada com FITC (Kit <sup>TM</sup> ApoDETECT anexina V-FITC, Invitrogen) e 5 µl de iodeto de propídio (marcador de perda da integridade da membrana nuclear). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as células foram levadas ao aparelho para posterior leitura.

#### **4.15 Técnica de Microscopia Confocal**

As células do lavado articular foram centrifugadas a 1.200 rpm, por 5 minutos, a 4°C (centrífuga Jouan, modelo BR4i), o sedimento celular foi ressuspenso em em PBS e contado com corante Turk (1:10). A partir da contagem, foi definido o volume de amostra que contém o número de células desejado ( $3 \times 10^5$ ). Células foram preparadas para citocentrifugação (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Após centrifugação, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos, e em seguida, foram submetidas a 3 lavagens, de 5 minutos cada, com PBS. As lamínulas foram bloqueadas com Fc Block (CD16/32-BD Biosciences), diluído em PBS-BSA 1% (1:100, 50 µL) por 30 minutos. Para realização de marcação intracelular as lamínulas foram incubadas por 30 minutos em uma solução de permeabilização celular (*Perm 35 Wash*- BD Bioscience)- 1:12 em PBS-BSA1%) e, em seguida, com o anticorpo primário *overnight*. Na sequência, as lamínulas foram lavadas 4 vezes por 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluorescência por 30 minutos. Subseqüentemente, se necessário e após lavagem, foram adicionados os anticorpos extracelulares. Por último, as lamínulas foram preparadas com Fluormount (Sigma Aldrich, USA

) para análise. Para obtenção das imagens foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse Ti com laser confocal C2, equipados com três diferentes lasers (excitação 405, 488 e 543 nm) e filtros de emissões de 450/50 nm (canal 1), 515/30 nm (canal 2) e 584/50 nm (canal 3). A leitura foi feita por um espelho dicromático de 405/488/543 nm. A intensidade de fluorescência foi medida utilizando um software Velocity 6,3 (Perkin-Elmer) e o perfil de fluorescência foi avaliada usando o Image J (NIH). Os anticorpos utilizados foram pNF-kb, DAPI, PI (iodeto de prodídeo) e Alexa 488, diluídos em solução de permeabilização (*perm wash*- BD Bioscience).

#### **4.16 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 por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 ou 4,15 mm<sup>2</sup> 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 mm<sup>2</sup> 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 hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão ( $\Delta$  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.

#### **4.17 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o software Prism, 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  $p \leq 0,05$ .

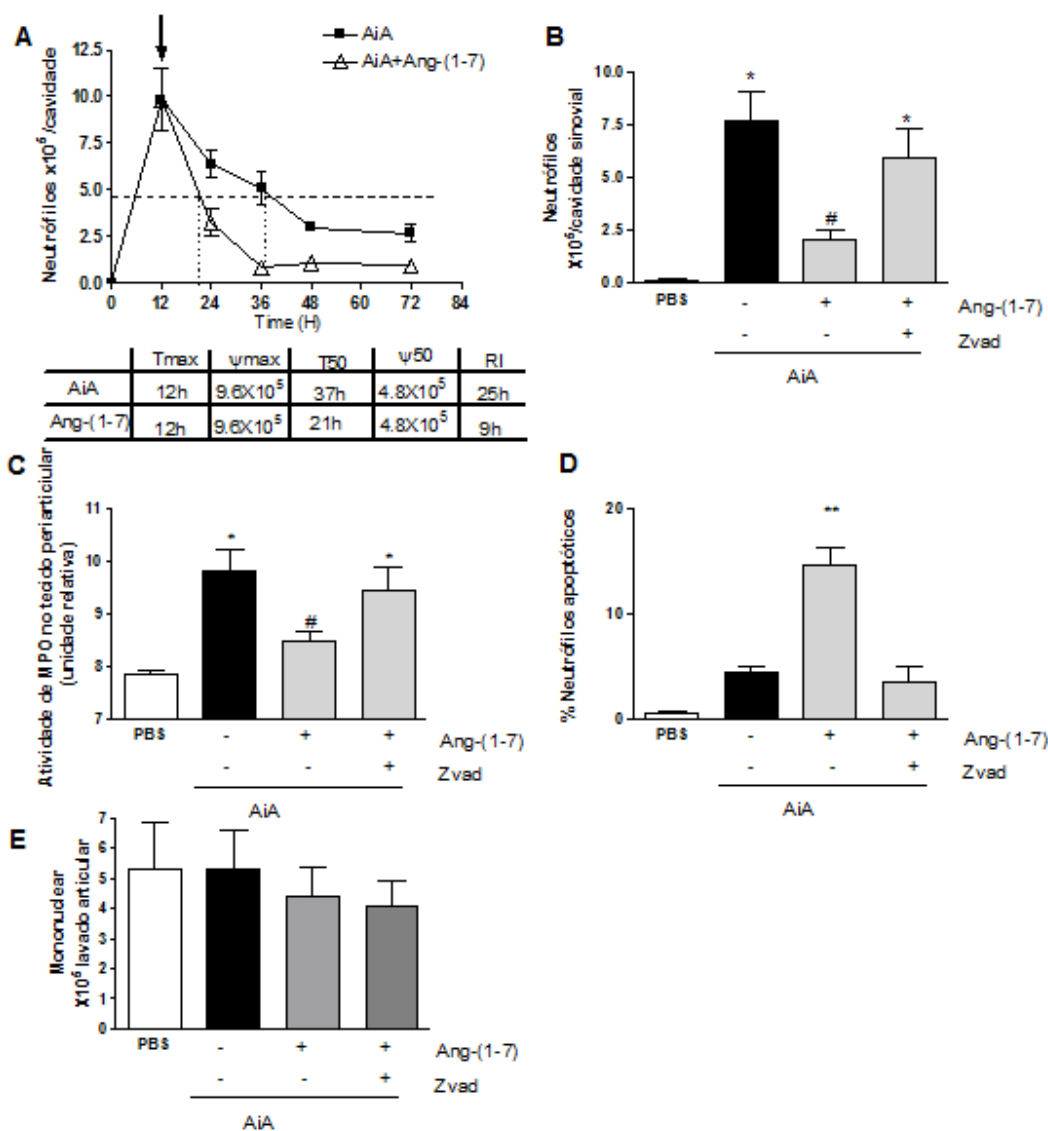
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Angiotensina-(1-7) antecipa a resolução da resposta inflamatória

Animais C57 BL/6J machos submetidos ao modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) foram tratados com a Ang-(1-7) 12 horas após o desafio com mBSA (tempo no qual existe um acúmulo máximo de neutrófilos na cavidade articular), como descrito na metodologia. Primeiramente, foi definido o efeito do tratamento com a Ang-(1-7) no acúmulo de neutrófilos na cavidade articular, em termos, quantitativos, utilizando um cálculo matemático (BANNENBERG *et al.*, 2005; CHIANG *et al.*, 2013) que define o índice de resolução (figura 4A). O lavado articular foi coletado em 12, 24, 36, 48 e 72 horas após o estímulo com mBSA. O tratamento com a Ang-(1-7) foi feito no pico da inflamação, 12 horas após o desafio. O número de PMN e células mononucleares foi determinado pela contagem diferencial de leucócitos. Assim, foi verificado que o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de diminuir o intervalo de resolução (RI). Os animais não tratados apresentaram um RI de 25 horas, enquanto os tratados com Ang-(1-7) apresentaram um RI de 9h. Ao analisar os valores de RI, ficou evidente que a Ang-(1-7) foi capaz de antecipar a resolução da resposta inflamatória em 16 horas. Além disso, o tratamento com Ang-(1-7) diminuiu a atividade MPO, que é a medida indireta na quantidade de neutrófilos no tecido peri-articular (figura 4C) e o número de neutrófilos na cavidade sinovial (figura 4D). O número de monócitos não foi alterado pelo tratamento com a Ang-(1-7) (figura 4 E).

O próximo passo foi verificar se a diminuição do acúmulo de neutrófilos estava associado a um aumento da apoptose dessas células. O tratamento com Ang-(1-7) aumentou a porcentagem de neutrófilos apoptóticos na cavidade sinovial, indicando que esse peptídeo é capaz de promover a antecipação da resolução da resposta inflamatória por aumentar a apoptose

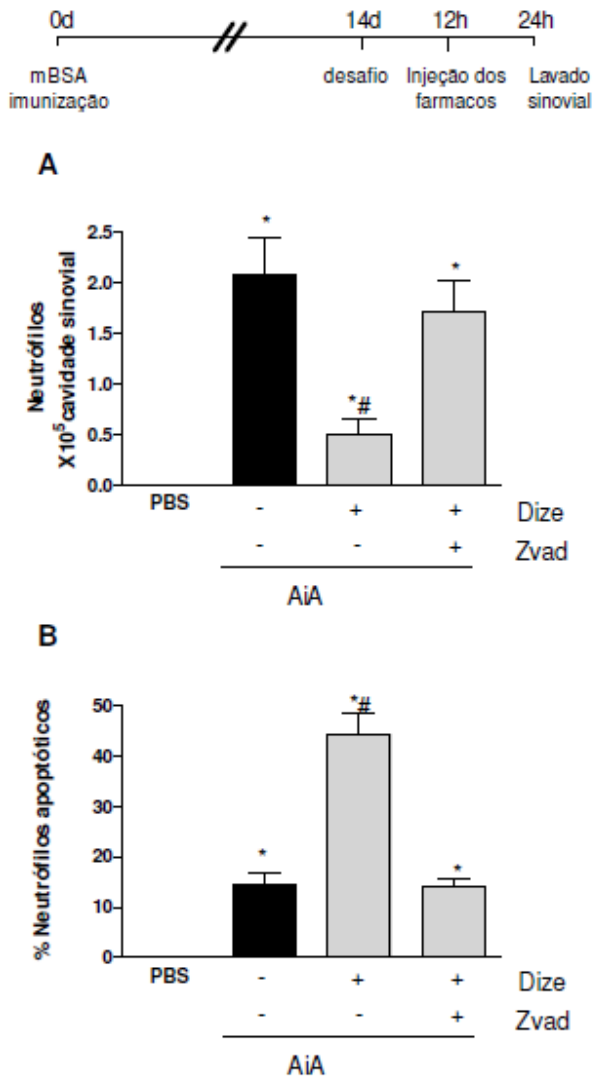
de neutrófilos (Figura 4D). Além disso, o efeito da Ang-(1-7) na redução do número de neutrófilos na cavidade e no aumento de apoptose de neutrófilos foi revertido quando os animais receberam o tratamento prévio com o Zvad-fmk (Figure 4B-D). Esse fármaco é um pan-inibidor de caspase, incluindo a caspase-3, sugerindo que os efeitos da Ang-(1-7) foram dependentes da ativação de caspase (figura 4B-D).



**Figura 4 - Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7) na resolução inflamatória em modelo de artrite induzida por antígeno (AIA).** Ang-(1-7) (100 ng/cavidade) ou veículo (PBS 1X estéril) foram administrados por via intra-articular de forma terapêutica, 12 horas após o desafio com mBSA. O grupo de animais tratados com Zvad-FMK (1 mg/kg por via intra-peritoneal) recebeu o tratamento 15 minutos antes da injeção de Ang-(1-7). O índice de resolução do grupo de animais tratados e não tratados com a Angiotensina-(1-7) (A), o número de neutrófilos na cavidade sinovial (B), o número relativo de neutrófilos no tecido periarticular, determinado pela atividade da enzima mieloperoxidase (C), porcentagem de neutrófilos apoptóticos no lavado sinovial (D) e número de monócitos na cavidade sinovial (E) 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 ao do grupo controle (PBS) e (#) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1X) (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).

## **5.2 A ativação endógena de Angiotensina-(1-7) antecipa a resolução da inflamação.**

Como mostrado acima, o tratamento farmacológico com a Ang-(1-7) foi capaz de antecipar a resolução da resposta inflamatória. Sabendo disso, animais foram submetidos ao modelo de AIA e tratados com o ativador endógeno de ECA2 (DIZE) no pico da inflamação, afim de saber se o aumento da produção endógena de Ang-(1-7) teria o mesmo efeito na resolução. O tratamento com DIZE diminuiu o número de neutrófilos na cavidade sinovial (figura 5A) e aumentou a porcentagem de neutrófilos apoptóticos (figura 5B) indicando que, assim como a administração exógena de Ang-(1-7), a indução da produção endógena também é capaz de antecipar a resolução da inflamação. O tratamento dos animais com Zvad-fmk reverteu o efeito do DIZE, o que indica que a ação desse fármaco em induzir a resolução é dependente de caspases (Figura 5A/B).

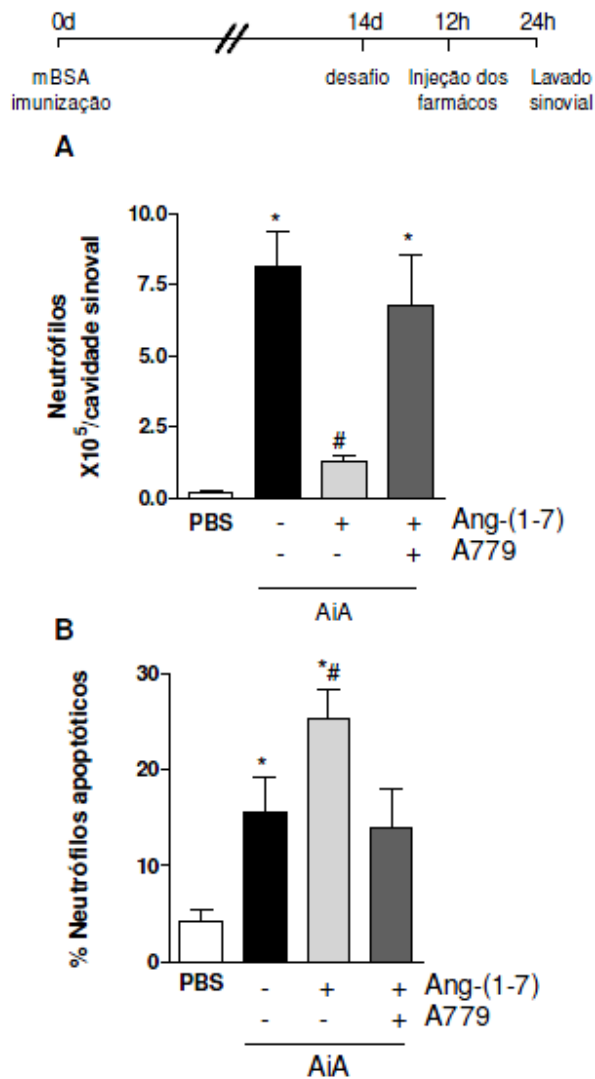


**Figura 5 - Efeito da administração local de DIZE (ativador endógeno de ECA 2) na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA).** O DIZE (1 µg/cavidade) ou veículo (PBS 1X estéril) foram administrados por via intra-articular, 12 horas após o desafio com mBSA, o grupo de animais tratados com Zvad-FMK (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) a porcentagem de neutrófilos apoptóticos na cavidade sinovial (B). As barras representam a média  $\pm$  EPM de 6 camundongos por grupo. (\*) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao do grupo controle (CC) e (#) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1X) (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).

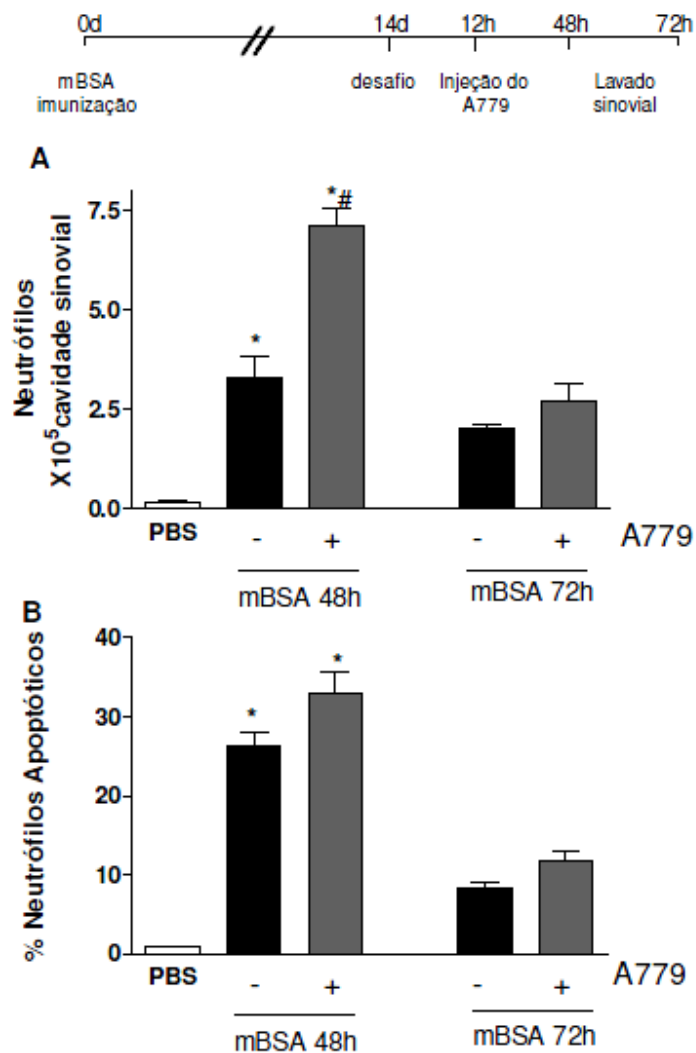
### **5.3 A779, antagonista do receptor Mas, bloqueia a ação pró-resolutiva de Ang-(1-7) e atrasa a resolução natural.**

Para saber a importância do receptor Mas na ação da Ang-(1-7) no processo de resolução da resposta inflamatória, animais foram submetidos ao modelo de AIA e tratados com o antagonista do receptor, o A779, 15 minutos antes do tratamento com a Ang-(1-7). O tratamento com A779 inibiu a ação da Ang-(1-7), revertendo a diminuição do número de neutrófilos (Figura 6A) e o aumento da porcentagem de neutrófilos apoptóticos na cavidade sinovial (Figura 6B), indicando que a ação pró-resolutiva de Ang-(1-7) depende do receptor Mas.

O próximo passo foi avaliar se o tratamento somente com o A779 interferiria no curso da resposta inflamatória. Animais foram submetidos ao modelo de AIA, tratados com A779 12 horas após o desafio com mBSA e o infiltrado inflamatório avaliado 48 e 72 horas após o desafio. Na figura 7 A, podemos observar que o número de neutrófilos na cavidade articular é maior nos animais tratados com A779 48 horas após o desafio com o antígeno, mas não depois de 72 horas. Sendo assim, o A779 pode atrasar a cinética de resolução natural da AIA, mas essa resolução irá ocorrer de forma natural, tanto nos animais controle quanto nos animais tratados com o A779. Não houve diferença significativa no número de neutrófilos apoptóticos nos tempos avaliados (Figura 7B).



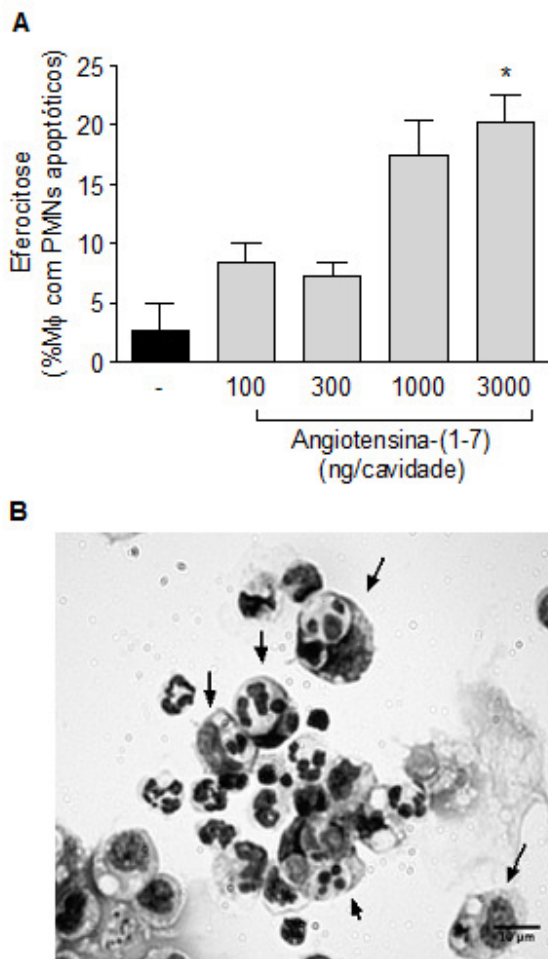
**Figura 6 - Efeito do A779, antagonista do receptor MAS, na resolu3o inflamat3ria, em um modelo de artrite induzida por ant3geno (AIA).** A Angiotensina-(1-7) (100 ng/cavidade) e/ou A779 (200 ng/cavidade) ou veiculo (PBS 1X est3ril) foram administrados por via intra-articular, 12 horas ap3s o desafio com mBSA. O n3mero de neutr3filos na cavidade sinovial (A) e a porcentagem de neutr3filos apopt3ticos na cavidade sinovial (B). As barras representam a m3dia +-EPM de 6 camundongos por grupo. (\*) para  $p \leq 0,05$  quando comparado a m3dia do grupo controle (PBS) e (#) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo veiculo (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).



**Figura 7 - Efeito do A779, antagonista do receptor MAS, na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA).** O A779 (200ng/cavidade) ou veiculo (PBS 1X estéril) foram administrados por via intra-articular 12 horas após o desafio com mBSA. O número de neutrófilos na cavidade sinovial (A) e a porcentagem de neutrófilos apoptóticos na cavidade sinovial (B) foram avaliados 48 e 72 horas após o desafio. As barras representam a média  $\pm$  EPM de 6 camundongos por grupo. (\*) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle (PBS) e (#) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1X) (Two-way ANOVA).

#### **5.4 Ang-(1-7) aumenta a eferocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos.**

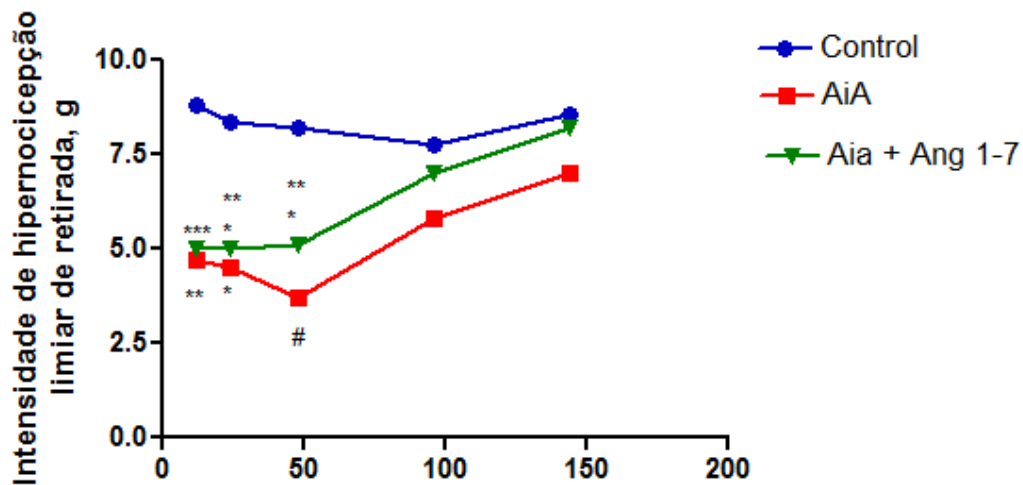
Uma vez que a Ang-(1-7) antecipou a resolução da resposta inflamatória por diminuir número de neutrófilos no sítio da inflamação e aumentar a apoptose dessas células, o próximo passo foi verificar se esse fármaco estaria induzindo a eferocitose de neutrófilos apoptóticos. A eferocitose é um processo fundamental para uma resolução adequada do processo inflamatório (DALLI; SERHAN, 2012). Para tal, animais C57 previamente desafiados com zimosan intraperitonealmente (i.p.), receberam neutrófilos humanos apoptóticos (i.p) 75 h após o desafio e foram divididos da seguinte maneira: animais que receberam somente neutrófilos apoptóticos (i.p.) e animais que receberam Ang-(1-7) em diferentes doses (100, 300, 1000 e 3000 ng/cavidade, i.p.) meia hora antes dos neutrófilos apoptóticos (i.p.). Uma hora e meia após receberem os neutrófilos apoptóticos, os animais foram eutanasiados e as células coletadas da cavidade peritoneal para análise da eferocitose. O tratamento com Ang-(1-7) foi também eficaz em aumentar a capacidade eferocítica dos macrófagos, uma vez que percebemos o aumento do número de macrófagos com neutrófilos apoptóticos internalizados em animais previamente tratados, como podemos observar na figura 8A-B.



**Figura 8 - Angiotensina-(1-7) aumenta a eferocitose.** Camundongos estimulados 72 horas com zimosan (1mg/animal), receberam injeção intraperitoneal com neutrófilos humanos apoptóticos (PMN incubados por 1 hora com estaurosporina), 1 hora e meia após a injeção de neutrófilos apoptóticos, os camundongos foram eutanasiados e retirado o lavado peritoneal. Aumento de eferocitose dos neutrófilos apoptóticos com macrófagos, de forma dose dependente (A) e imagem demonstrativa de eferocitose de neutrófilos apoptóticos com a dose de 3000 ng/cavidade (B). As barras representam a mediana  $\pm$  EPM de 5 camundongos por grupo. (\*) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle (PBS) e (#) para  $p \leq 0,05$  quando comparado a média do grupo veículo.

### 5.5 Ang-(1-7) diminui a nociceção

A medida de hipernociceção nos animais foi analisada 12, 24, 48, 96 e 144 horas após o desafio com mBSA. Os animais do grupo AIA foram capazes de tolerar por menos tempo a pressão na pata, retirando-a mais rapidamente quando comparados com os animais do grupo controle (control), que não foi desafiado com o antígeno. Os animais que receberam a Ang-(1-7) voltaram a tolerar uma pressão maior na pata 48 horas após o desafio com mBSA, enquanto os animais que não receberam tratamento só voltam a tolerar uma maior pressão 96 horas após o desafio. Esse dado indica um possível efeito antinociceptivo de Ang-(1-7) (Figura 9).



**Figura 9 - Efeito da administração local de Angiotensina-(1-7) na hipernociceção, em um modelo de artrite induzida por antígeno.** Ang-(1-7) (100 ng/kg) ou veículo (PBS 1X estéril) foram administrados por via intra-articular 12 horas após o desafio com mBSA. A intensidade de hipernociceção foi avaliada 12, 24, 48, 96 e 144h após a indução da artrite. As barras representam a média  $\pm$  EPM de 6 camundongos por grupo. (\*) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle (Control) e (#) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1X) (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls). O eixo Y indica o número de horas após o desafio com mBSA.

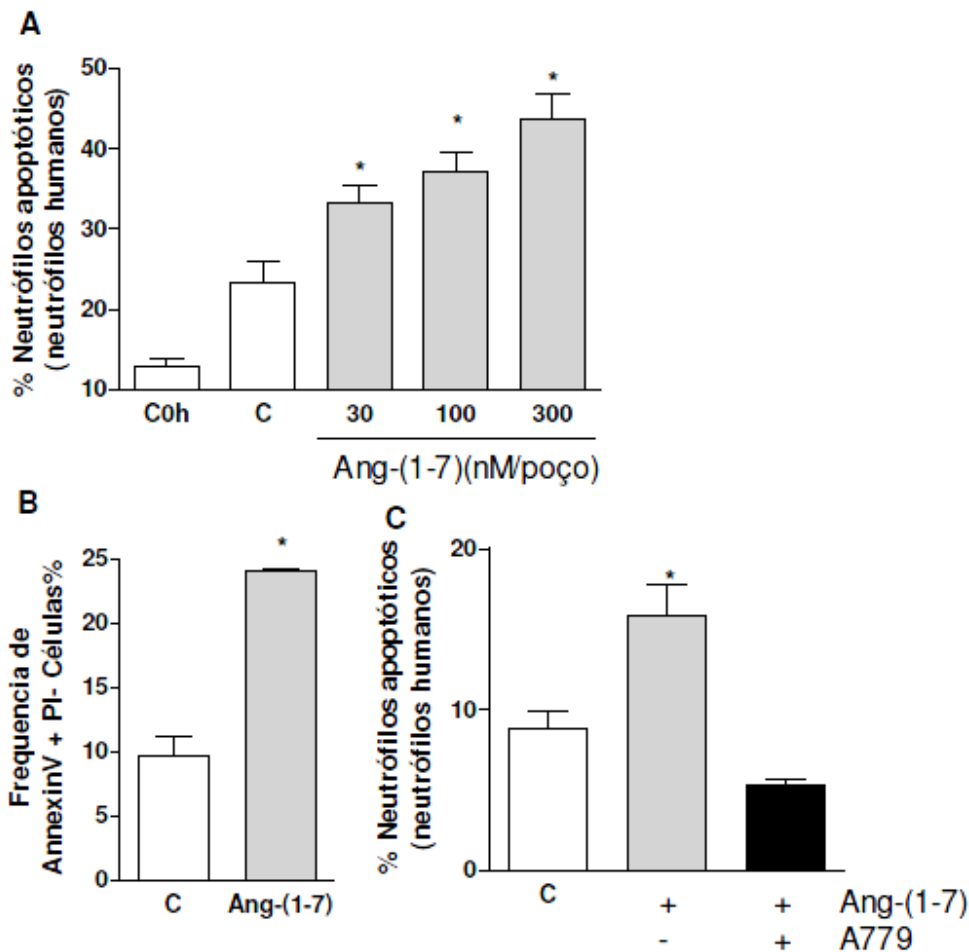
## **5.6 Ang-(1-7) induz apoptose em neutrófilos humanos**

No modelo AIA em camundongos, verificamos que a Ang-(1-7) antecipa a resolução da resposta inflamatória por diminuir número de neutrófilos na cavidade sinovial, aumentar a apoptose de neutrófilos e aumentar a eferocitose de neutrófilos apoptóticos e seus efeitos são dependentes de caspase e revertidos pelo antagonista do receptor de Mas, o A779. No entanto, a ação direta da Ang-(1-7) em células do sistema imune é pouco elucidada. Diante disso, o próximo passo foi saber se Ang-(1-7) teria ação pró-apoptótica em neutrófilos humanos.

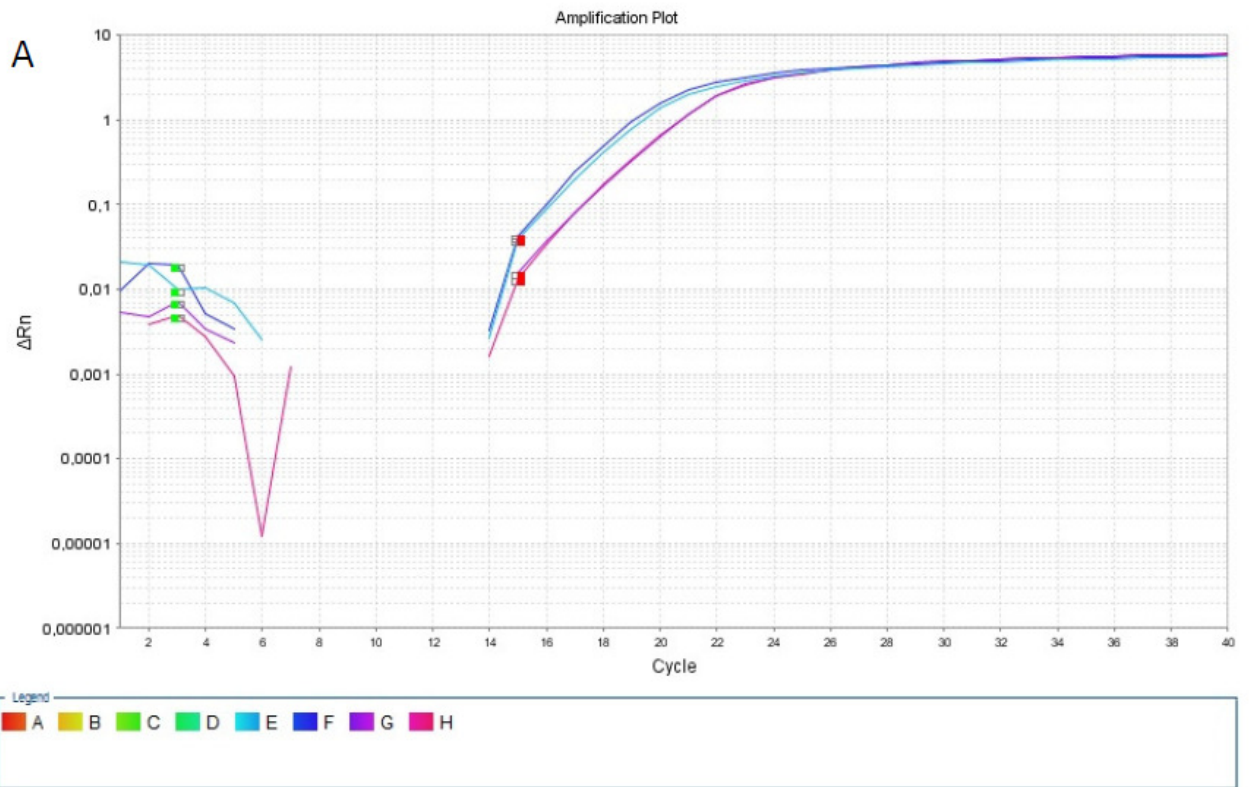
A incubação por 6 horas com Ang(1-7) foi capaz de aumentar, de forma dose- dependente, a porcentagem de neutrófilos humanos apoptóticos na cultura, quando analisados morfolologicamente (figura 10A). Foi também observado o aumento da ligação da anexina V nos neutrófilos incubados com a Ang-(1-7), indicando que morte de neutrófilos foi por apoptose (Figura 10B). A fosfatidilserina é um componente fosfolipídico que fica exposto na superfície celular quando a célula apresenta mudanças estruturais provenientes da apoptose, auxiliando o reconhecimento dessas células apoptóticas por fagócitos. A anexina V se liga seletivamente a fosfatidilserina, como essa anexina V esta marcada com o fluoróforo FITC, ela sinaliza a presença de células apoptóticas. Quando o A779 foi acrescentado à cultura de neutrófilos 15 minutos antes do tratamento com a Ang-(1-7), ele foi capaz de reverter o efeito da Ang-(1-7), indicando que os seus efeitos em neutrófilos humanos são mediados pelo receptor Mas, como observado na Figura 10 C.

Não havia sido descrita a presença do receptor Mas em neutrófilos humanos. Para identificação desse receptor nos neutrófilos humanos do sangue periférico, realizamos PCR em tempo real e imunofluorescência, utilizando anticorpo para o receptor Mas marcado com a cor verde.

Observamos a presença do receptor Mas em neutrófilos humanos pela reação de PCR (Figura 11C/D). Além disso, a presença do receptor Mas, marcado com a cor verde, pode ser também notada em neutrófilos marcados com um anticorpo anti-receptor Mas (Figura 11E).

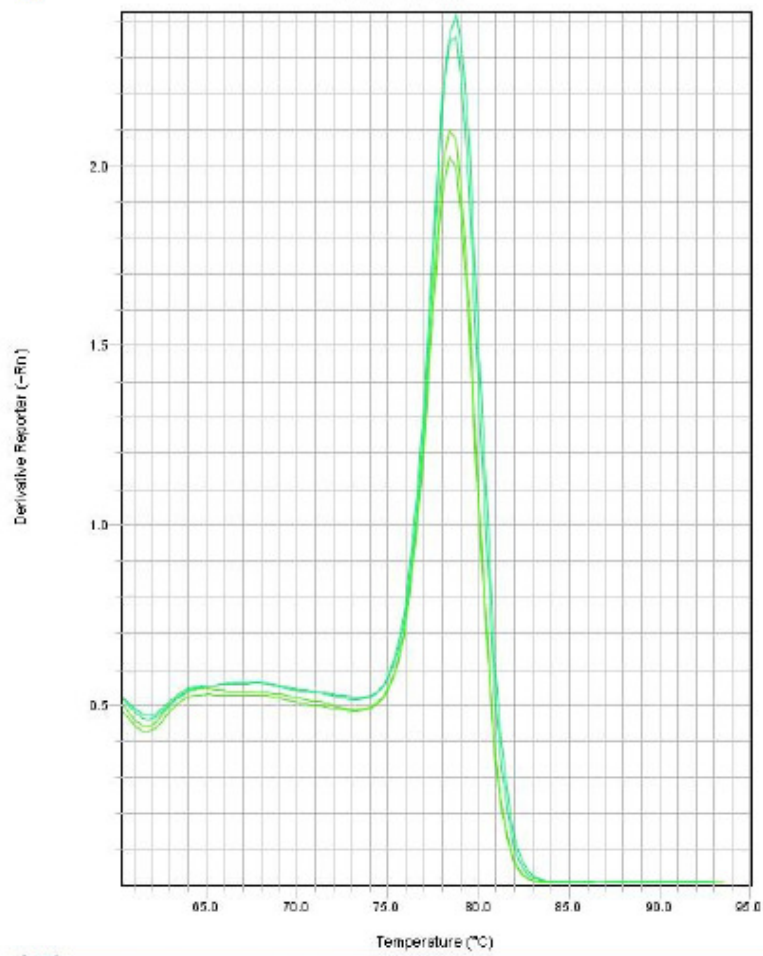


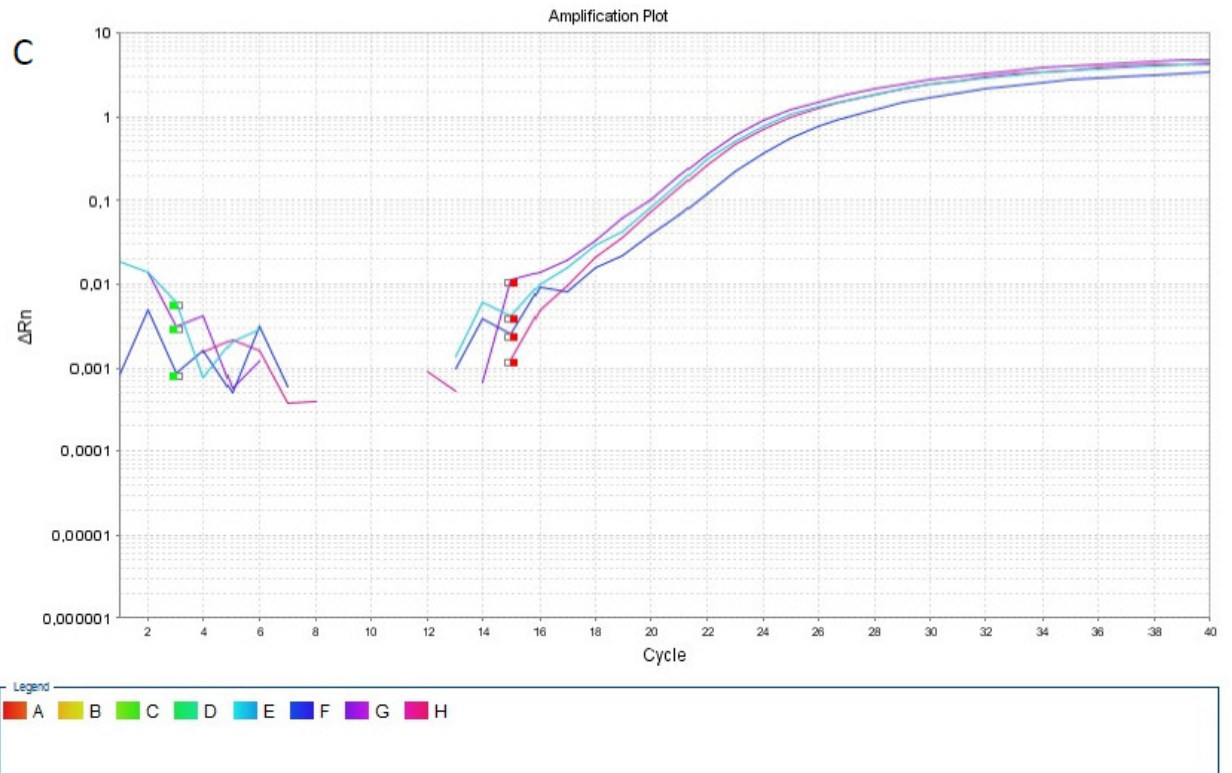
**Figura 10 - Efeito da Angiotensina-(1-7) em cultura de neutrófilos humanos do sangue periférico.** Ang-(1-7) ( $1 \times 10^6$  células em 150  $\mu$ l RPMI, tratadas 30, 100 ou 300nm/50 $\mu$ l de Ang-(1-7)), C( $1 \times 10^6$  células em 150 $\mu$ l RPMI, sem tratamento 50 $\mu$ l de RPMI), incubadas por 6 horas, A779 (300 nM/poço). A porcentagem de células apoptóticas foi avaliada por análise morfológica 6 horas após a incubação com Ang-(1-7) e o C0h para controle do procedimento (A), o aumento da porcentagem de Anequina-V com o tratamento com Angiotensina-(1-7) na dose de 300 nM/poço avaliado por citometria de fluxo (B) e o reversão da ação da Ang-(1-7) (300nM/poço) com o tratamento com o A779 (300 nM/poço). As barras representam a média  $\pm$ -EPM de 6 camundongos por grupo. (\*) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle (CC) e (#) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (artrítico não tratado, PBS1 X).

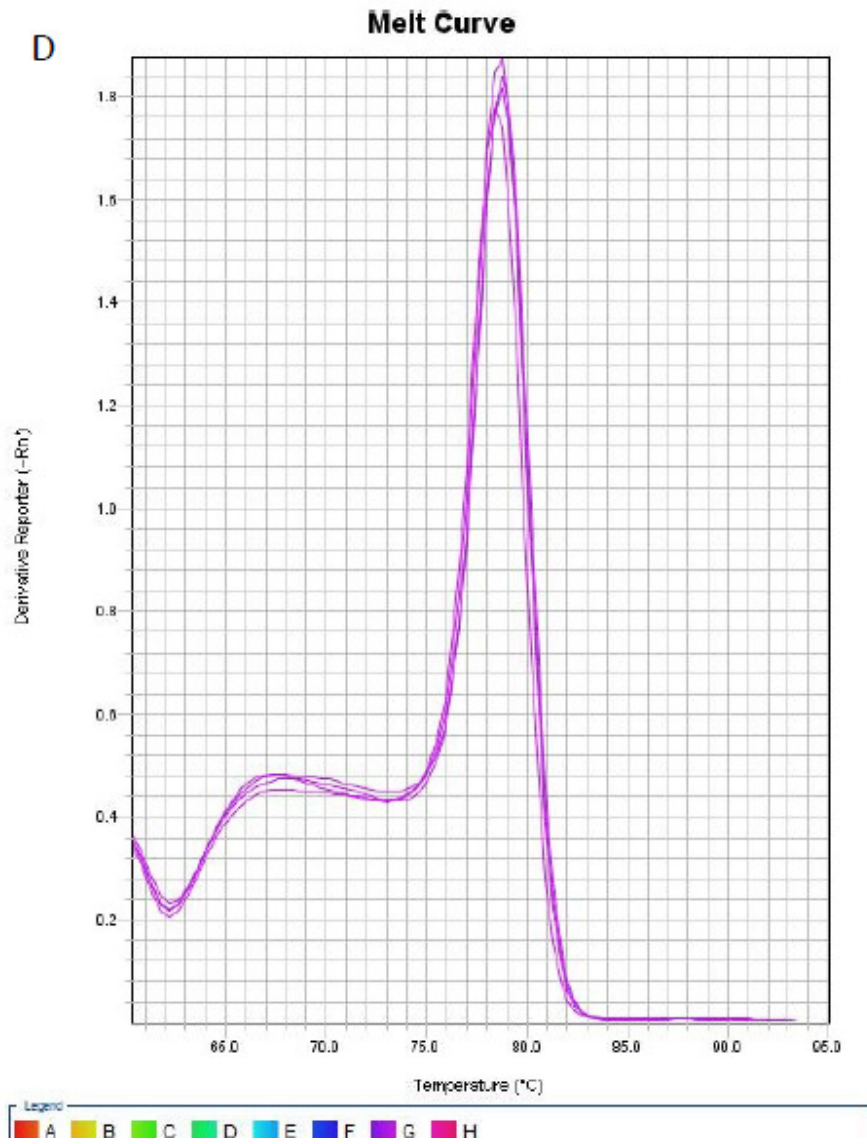


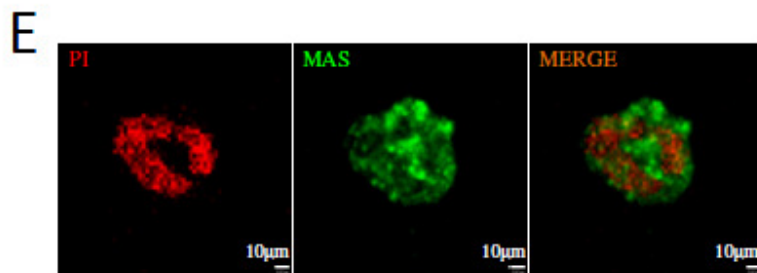
B

### Melt Curve





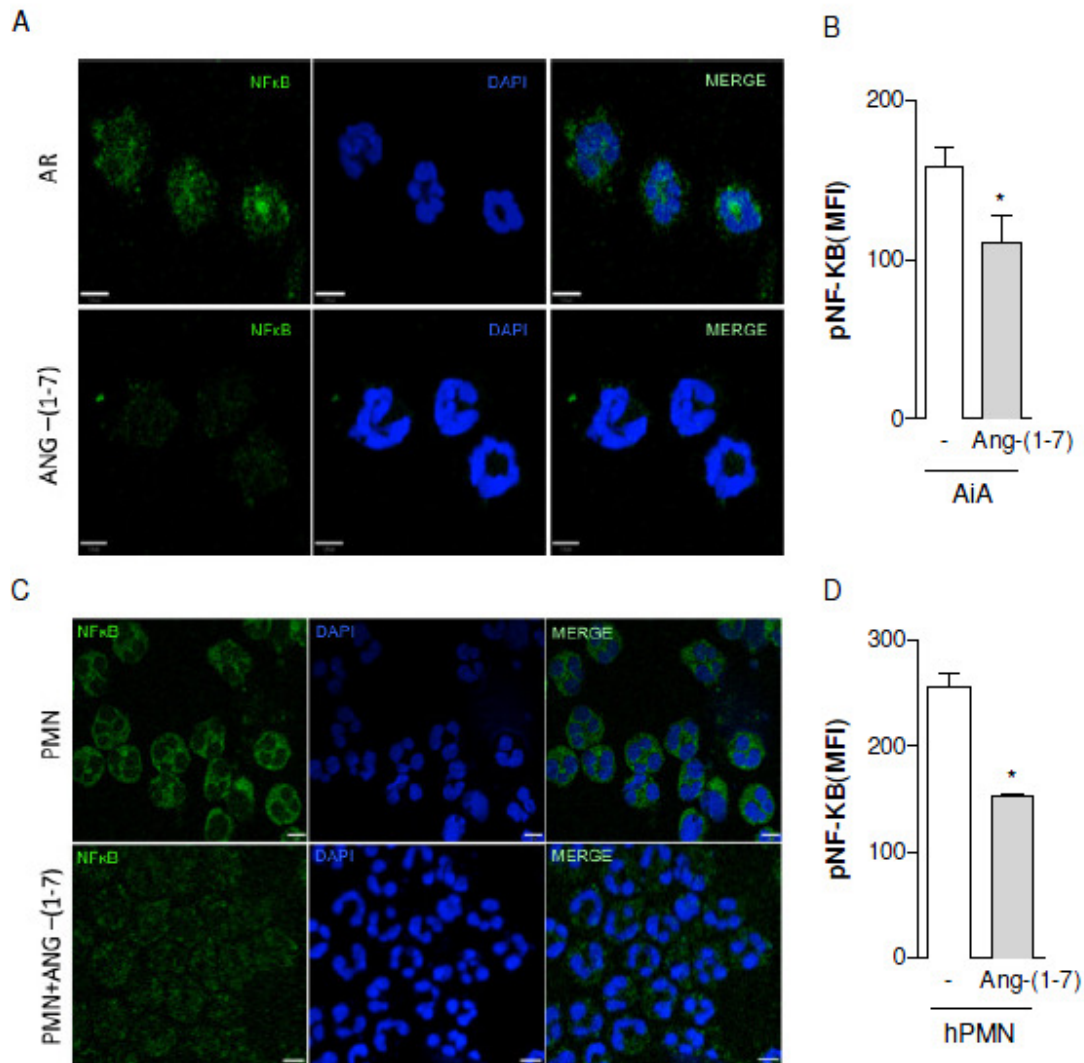




**Figura 11 - Presença do receptor MAS em neutrófilos do sangue periférico humano.**  $1 \times 10^6$  células (neutrófilos) em 150  $\mu$ l de RPMI. GAPDH, gene constitutivo, utilizado como controle positivo da amostra (A), curva de MELT controle para amplificação específica para o mRNA de GAPDH (B), presença do mRNA do receptor MAS (C), curva de MELT, controle para a amplificação específica do mRNA do receptor MAS (D). Imagem de confocal de neutrófilo humano com o receptor MAS marcado em verde e o núcleo de iodeto de propídeo (PI/vermelho) (E).

### 5.7 Ang-(1-7) diminui a fosforilação de NF- $\kappa$ B em neutrófilos

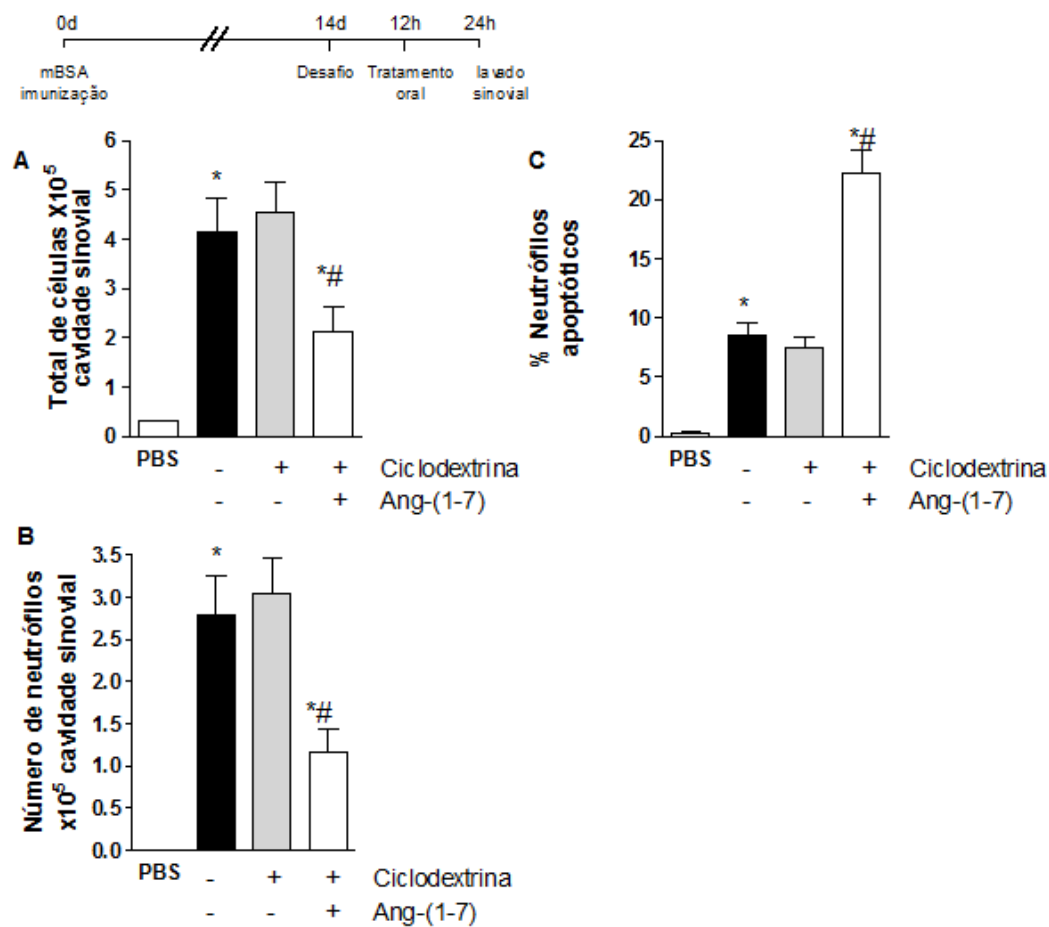
Dados anteriores do grupo mostraram importância do NF- $\kappa$ B para sobrevivência de leucócitos (LOPES *et al.*, 2011b; SOUSA *et al.*, 2009). Utilizando a técnica de microscopia de fluorescência confocal, observamos que o tratamento com a Ang-(1-7), no pico da resposta inflamatória, foi capaz de diminuir a fosforilação de NF- $\kappa$ B (Figura 12A e B), um importante fator de transcrição que participa da ativação da transcrição de citocinas inflamatórias e indução de sobrevivência celular. A Ang-(1-7) também foi capaz de diminuir a fosforilação de NF- $\kappa$ B em neutrófilos humanos, como pode ser visto na figura 12C e D.



**Figura 12 - Angiotensina-(1-7) diminui ativação de NF-kB.** (A) em um modelo de AIA em camundongos C57BL/6J, análise de perfil de fluorescência em neutrófilos de animais desafiados com mBSA tratados ou não com Ang- (1-7), animais tratados tem sinal intracelular mais baixa para o NF-kB em comparação com não tratados,60x. Escala = 10µm.(B)Quantificação da fluorescência do número de neutrófilos que mostra um decréscimo de NF-kB em neutrófilos tratados com Ang- (1-7) em comparação com os neutrófilos não tratados. (C) A análise do perfil de fluorescência dos neutrófilos humanos(PMN), sinal intracelular mais baixo para o pNF-kB em neutrófilos tratados em comparação com os não tratados. 60x. Escala = 10µm. (D) fluorescência quantificação do número de neutrófilos que mostra um decréscimo na coloração de NF-kB em neutrófilos tratados com Ang- (1-7) em comparação com os neutrófilos não tratados. As barras mostram a média ± SEM de resultados com células. \*  $p \leq 0.05$  quando comparado com neutrófilos tratados; #  $p \leq 0.05$  quando comparado com o controle. (ANOVA seguido por pos-teste Student-Newman-Keuls).

## **5.8 O tratamento sistêmico com o composto HP $\beta$ CD/Ang-(1-7) antecipa a resolução da resposta inflamatória**

Uma nova formulação da molécula de Ang-(1-7) incorporada em oligossacarídeos acíclicos (ciclodextrina/ Hp $\beta$ CD) aumentou o potencial farmacológico desse heptapeptídeo, pois possibilitou a administração oral do mesmo sem perder suas funções biológicas (FELTENBERGER *et al.*, 2013). Sendo assim, nós testamos a ação da administração oral do composto HP $\beta$ CD/Ang-(1-7) na resolução da inflamação. O tratamento com o HP $\beta$ CD/Ang-(1-7) diminuiu o número total de células e de neutrófilos no lavado articular (Figura 12 A/B) e aumentou a porcentagem de neutrófilos apoptóticos no lavado articular (Figura 12 C), indicando que a administração oral de Ang-(1-7) em formulação com ciclodextrina produz efeitos semelhantes aos da Ang-(1-7) quando administrada na articulação.



**Figura 13 - Efeito da administração oral de angiotensina-(1-7) na resolução inflamatória, em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA).** A composto HP $\beta$ CD/Ang-(1-7) (60 $\mu$ g/Kg de Ang-(1-7) e 92  $\mu$ g/Kg of HP $\beta$ CD), PBS (PBS 1X estéril) ou veículo (92  $\mu$ g/Kg of HP $\beta$ CD, ciclodextrina) foram administrados por via oral (gavagem em água destilada) 12 horas após o desafio com mBSA. O número total de células (A), o número de neutrófilos na cavidade sinovial (B) a porcentagem de neutrófilos apoptóticos na cavidade sinovial (C). As barras representam a média  $\pm$  EPM de 6 camundongos por grupo. (\*) para  $p \leq 0,05$  quando comparado ao 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).

## 6 DISCUSSÃO

No processo inflamatório, para que haja o mínimo de lesão tecidual, a resolução da inflamação deve ser precisamente controlado. Acredita-se que defeitos na fase resolutiva pode desencadear o surgimento de doenças crônicas como a artrite (LOPES *et al.*, 2011a; PERRETTI *et al.*, 2017). Dessa forma, o estudo de mecanismos ou moléculas que facilitam ou antecipam o processo de resolução da resposta inflamatória tem sido alvo de grande interesse para o tratamento de uma serie de doenças. Nesse estudo, nós investigamos os efeitos e o potencial terapêutico da Ang-(1-7) em um modelo experimental de artrite. Foi demonstrato que o tratamento com a Ang-(1-7), no pico da inflamação, (i) diminui o número de neutrófilos no lavado e no tecido articular, (ii) induz apoptose de neutrófilos, (iii) aumenta a eferocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos. As ações pró-resolutivas da Ang-(1-7) são dependentes do receptor Mas, já que nos experimentos feitos com o antagonista do receptor, A779, os efeitos foram revertidos. O processo de resolução antecipado pela Ang-(1-7) é caspase dependente, já que o tratamento com Zvad-fmk bloqueou as ações da Ang-(1-7), e está associado com a diminuição de NF- $\kappa$ B. Ang-(1-7) também induz apoptose em neutrófilos humanos *in vitro*. Juntos esse resultados demonstram pela primeira vez o efeito pró-resolutivo da Ang-(1-7) em um modelo de artrite dependente de neutrófilos e seu efeito *in vitro* em neutrófilos humanos.

Estudos anteriores demonstraram que a administração preventiva de Ang-(1-7), antes da administração do estímulo inflamatório, diminui parâmetros inflamatórios importantes (DA SILVEIRA *et al.*, 2010a; MAGALHAES *et al.*, 2016). No modelo de artrite, por exemplo, a administração de Ang-(1-7) ou o agonista oral do receptor Mas, o AVE0091, diminuiu o recrutamento de neutrófilos, a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e também da quimiocina CXCL1, além

de melhorar parâmetros histológicos (DA SILVEIRA *et al.*, 2010a). O agonista AVE0091 administrado antes da lesão também apresentou efeitos protetores no modelo de isquemia e reperfusão renal, diminuindo a lesão do tecido, inibindo o recrutamento de leucócitos e da quimiocina CXCL1 (BARROSO *et al.*, 2012b). Nos estudos anteriores, nenhum tratamento foi administrado quando a inflamação já estava instalada ou presente. Assim, nossos dados são únicos em demonstrar a ação terapêutica de Ang-(1-7), reduzindo a inflamação por induzir apoptose de neutrófilos e eferocitose. Demonstrar a ação terapêutica de uma via anti-inflamatória é importante, pois, na clínica, o paciente procura por tratamento quando a inflamação já está instalada.

Sabe-se que a ativação de caspases iniciadoras e efetoras é essencial para o desencadeamento de apoptose (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). Foi demonstrado que o tratamento com o inibidor de caspases, o Zvad-fmk, impediu a apoptose e resolução neutrófilica induzida pela Ang-(1-7), indicando que a ação desse peptídeo é dependente de caspases. No modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, animais tratados com maresina-1 no pico da inflamação tiveram uma aceleração da resolução por promover apoptose de neutrófilos com consequente diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. Esse aumento foi dependente de caspase, pois o tratamento concomitante com o Zvad-fmk inibiu a ação da maresina-1 na resolução (GONG *et al.*, 2015). Esses dados, em um modelo de lesão pulmonar, que também é um modelo dependente de neutrófilos, estão de acordo com os nossos achados e indicam também um mecanismo resolutivo dependente de caspase.

A ativação do eixo PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B é uma importante via de sobrevivência de leucócitos, incluindo os neutrófilos (SOUSA *et al.*, 2010). NF- $\kappa$ B é um ponto de convergência de várias

vias de transdução de sinal, transmitindo sinais dessas moléculas para o núcleo e promovendo a ativação da transcrição de genes associados à inflamação e sobrevivência celular (BONIZZI; KARIN, 2004). Dessa forma, inibir essa via resulta em indução de apoptose e resolução da inflamação. A resolução de uma inflamação está associada ao bloqueio da via de NF- $\kappa$ B. Por exemplo, a anexina A1, uma molécula que tem efeito pró-resolutivo, exerce sua ação em parte pela inibição e/ou regulação da expressão ou ativação de NF- $\kappa$ B (MAGALHAES *et al.*, 2016; VAGO *et al.*, 2012). Além disso, no modelo de artrite induzida por antígeno, o tratamento no pico da inflamação neutrófila com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou superóxido dismutase, resolve a inflamação neutrófila por inibir a expressão de P-Akt/NF- $\kappa$ B e induzir apoptose de neutrófilos (LOPES *et al.*, 2011a). Corroborando com esses estudos, nossos dados mostram que a Ang-(1-7) diminui a fosforilação de NF- $\kappa$ B e esse efeito explica, pelo menos em parte, a ação desse peptídeo na resolução da resposta inflamatória neutrófila. O complexo NF- $\kappa$ B encontra-se no citoplasma ligado a proteína inibitória I $\kappa$ B que impede a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, sua ligação ao DNA e a transcrição de genes de moléculas inflamatórias. A fosforilação e degradação de I $\kappa$ B são necessárias para que ocorra a ativação do NF- $\kappa$ B e a consequente regulação da transcrição de genes que participam de diferentes processos celulares, incluindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (BALDWIN, Jr., 1996; MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016). Sendo assim, NF- $\kappa$ B é considerado ativado quando se encontra fosforilado. No nosso trabalho os dados relacionados ao NF- $\kappa$ B mostram a marcação com o anticorpo pNF- $\kappa$ B ainda no citoplasma. Acreditamos que, no tempo avaliado, NF- $\kappa$ B ainda não tenha se traslocado para o núcleo, mas ele está ativado e, conseqüentemente, apto a realizar suas funções na ativação de genes.

O efeito pró-resolutivo da administração de Ang-(1-7) no pico da inflamação é dependente do receptor Mas, já que a administração do antagonista A779 reverte seus efeitos. No

estudo em que se observou a participação de ECA2 na fibrose renal de animais deficientes para a apolipoproteína (ApoE), o A779 inibiu os efeitos benéficos de ECA2 na lesão e fibrose renal (CHEN *et al.*, 2016). No modelo murino de asma, o A779 reverteu os efeitos da Ang-(1-7) em suprimir ERK1/2 e NF- $\kappa$ B (EL-HASHIM *et al.*, 2012). Corroborando com esses dados, demonstramos também que o efeito de Ang-(1-7) é dependente do receptor Mas, já que a administração do A779 bloqueia as ações da Ang-(1-7) de diminuir número de neutrófilos na cavidade sinovial e induzir apoptose. Nossos dados também revelaram que o tratamento de animais com artrite com A779 atrasou a resolução natural, destacando que a produção endógena de Ang-(1-7) e a ativação do receptor Mas contribuem para resolução da inflamação.

O ativador endógeno de ECA2, o Dize (aceturato de diminazeno), exerce efeitos similares aos do tratamento com a Ang-(1-7), indicando que indução da produção endógena de Ang-(1-7) é capaz de induzir a resolução da inflamação neutrófilica. Na inflamação da retina induzida por LPS, a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/MAS apresenta atividades anti-inflamatórias. O tratamento com o Dize ativa essa via e confere os benefícios dessa ativação, ele inibe a resposta inflamatória induzida por LPS por aumentar a produção de Ang-(1-7), reduzir a expressão de Ang II e do receptor AT<sub>1</sub>, além de inibir p38MAPK, ERK1/2 e NF- $\kappa$ B (TAO *et al.*, 2016). Esses resultados são comuns aos que nós mostramos e sugerem que o tratamento com o Dize apresenta ação similar ao tratamento com a Ang-(1-7).

Nossos dados sugerem que a Ang-(1-7) tenha um efeito antinociceptivo. Mediadores pró-resolutivos como lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas além de estimularem e promoverem a resolução da inflamação, promovem também a regeneração de tecidos, eliminação de microorganismo e diminuem a dor inflamatória (CHIANG; SERHAN, 2017).

Desse modo, a Ang-(1-7) apresenta mais uma característica importante como uma molécula pró-resolutiva ao diminuir a dor inflamatória no modelo de artrite. Já foi descrito o papel de Ang-(1-7) em atenuar nocicepção em um modelo de dor óssea induzida por câncer (FORTE *et al.*, 2016). Na lesão de nervos periféricos, que induz dor neuropática grave, foi descrito que a ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) melhora a dor neuropática e sua inibição agrava a nocicepção (ZHAO *et al.*, 2015). No entanto, o nosso trabalho mostra o efeito terapêutico da Ang-(1-7), onde o tratamento foi realizado no pico da resposta inflamatória, quando a inflamação já estava em curso.

Foi verificado também que o tratamento com a formulação oral de Ang-(1-7) em HB $\beta$ CD apresenta efeitos semelhantes ao tratamento com a Ang-(1-7) local. Achados equivalentes foram encontrados no modelo de infarto do miocárdio produzido pela oclusão da artéria coronariana esquerda, onde o tratamento com a Ang-(1-7) em HB $\beta$ CD oral produziu efeitos semelhantes ao tratamento com a Ang-(1-7), ambos diminuíram os efeitos deletérios induzidos pelo infarto e atenuaram o comprometimento da função cardíaca (MARQUES *et al.*, 2011). Além disso, camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura tratados com Ang-(1-7)/HP $\beta$ CD apresentaram uma melhora do metabolismo comparado a camundongos que não receberam o tratamento, e esses efeitos de melhora no metabolismo já foram também observados com o tratamento com a Ang-(1-7) pura (FELTENBERGER *et al.*, 2013). Desse modo, o composto oral, assim como a Ang-(1-7), apresentaram efeitos semelhantes, o que aumenta o potencial farmacológico desse heptapeptídeo no tratamento de doenças, incluindo a artrite, já que ele pode ser administrado por diferentes vias sem a diminuição de suas funções biológicas.

Nesse trabalho, nós demonstramos que Angiotensina-(1-7) não altera o número de mononucleares/macrófagos. Manter o número de macrófagos e sua viabilidade é importante para os eventos finais da resolução da resposta inflamatória, pois além de secretar citocinas anti-inflamatórias, os macrófagos são as principais células que fagocitam células apoptóticas (DALLI; SERHAN, 2016; DALLI; SERHAN, 2012). Para a completa resolução da inflamação e retorno da homeostase do tecido, um ponto importante é a remoção eficiente de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, processo conhecido como eferocitose (SERHAN *et al.*, 2007). Macrófagos são usualmente classificados em macrófagos clássicos (M1) ou alternativamente ativados (M2), de acordo com a fase do processo inflamatório que se encontram. Macrófagos M1 apresentam pouca capacidade eferocítica, já os macrófagos M2 passam a exercer ações anti-inflamatórias e possuem maior capacidade de eferocitose (MICHLEWSKA *et al.*, 2009). Macrófagos com capacidade eferocítica aumentada, auxiliam na resolução da inflamação por exercerem uma absorção eficiente de células apoptóticas, evitando sua ruptura celular e liberação de conteúdos inflamatórios e também pela produção de mediadores anti-inflamatórios como, IL-10 e TGF $\beta$ , que atenuam as respostas pró-inflamatórias (KORNS *et al.*, 2011). Dessa forma, agentes que promovam a eferocitose contribuem para a resolução da resposta inflamatória (ORTEGA-GOMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013). Nossos dados demonstram que o tratamento com Ang-(1-7) aumenta a depuração de leucócitos apoptóticos. Esses dados abrem perspectivas para novos estudos, a fim de entender como a Ang-(1-7) potencializa a eferocitose e como esse peptídeo está envolvido na modulação do fenótipo de macrófagos para um perfil pró-resolutivo.

Vale a pena ressaltar que a Ang-(1-7) não apenas induz a resolução neutrófila mas também tem participação na resolução da inflamação eosinofílica. No trabalho de Barroso e Magalhães *et al.* (em submissão), foi mostrado que o tratamento terapêutico com Ang-(1-7) no

modelo de asma induzida por ovalbumina em camundongos, diminuiu o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar, aumentou o número de eosinófilos apoptóticos, acompanhado pelo aumento de caspase-3 e diminuição da ativação de NF- $\kappa$ B e fibrose pulmonar. Esses dados corroboram com os encontrados nesse trabalho, mostrando o potencial terapêutico do tratamento com a Ang-(1-7).

Em resumo, nosso conjunto de dados sugerem que o tratamento com a Ang-(1-7) atende aos três critérios para que uma molécula seja considerada um novo mediador para a resolução da inflamação: Ang-(1-7) diminui o acúmulo de leucócitos no tecido, e promove, além da diminuição do recrutamento de neutrófilos, uma indução da apoptose dessas células seguido pelo aumento da eferocitose por macrófagos, mostrando seu papel como potencial indutor da resolução podendo ser usado no tratamento de em diversas doenças.

## **7 CONCLUSÃO**

Nossos estudos demonstraram que Angiotensina-(1-7) antecipa a resolução da resposta inflamatória por induzir apoptose dependente de caspase, diminuição da ativação de NF- $\kappa$ B e a eferocitose de neutrófilos, além de antecipar a melhora da nocicepção. Esses dados apontam a Ang-(1-7) como possível fármaco pró-resolutivo no contexto de doenças dependentes da atividade do neutrófilo.

## 8 REFERÊNCIAS

### BIBLIOGRAFIA

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun.Rev.*, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol.Ther.*, v. 139, n. 2, p. 189-212, 2013

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. *J.Am.Soc.Nephrol.*, v. 10 Suppl 11, n. S30-S39, 1999

BALDWIN, A. S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 14, n. 649-683, 1996

BANNENBERG, G. L.; CHIANG, N.; ARIEL, A.; ARITA, M.; TJONAHEN, E.; GOTLINGER, K. H.; HONG, S.; SERHAN, C. N. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J.Immunol.*, v. 174, n. 7, p. 4345-4355, 2005

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. 808726-2012a

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. 808726-2012b

BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 16, n. 1, p. 51-67, 2016

BENNION, D. M.; HALTIGAN, E.; REGENHARDT, R. W.; STECKELINGS, U. M.; SUMNERS, C. Neuroprotective mechanisms of the ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in stroke. *Curr.Hypertens.Rep.*, v. 17, n. 2, p. 3-2015

BENNION, D. M.; ROSADO, C. A.; HALTIGAN, E. A.; REGENHARDT, R. W.; SUMNERS, C.; WATERS, M. F. Serum activity of angiotensin converting enzyme 2 is decreased in patients with acute ischemic stroke. *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.*, v. 17, n. 3, p. 2016

BERTONCELLO, N.; MOREIRA, R. P.; ARITA, D. Y.; ARAGAO, D. S.; WATANABE, I. K.; DANTAS, P. S.; SANTOS, R.; MATTAR-ROSA, R.; YOKOTA, R.; CUNHA, T. S.; CASARINI, D. E. Diabetic Nephropathy Induced by Increased Ace Gene Dosage Is Associated with High Renal Levels of Angiotensin (1-7) and Bradykinin. *J.Diabetes Res.*, v. 2015, n. 674047-2015

BESSIS, N.; DECKER, P.; ASSIER, E.; SEMERANO, L.; BOISSIER, M. C. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin.Immunopathol.*, v. 2017

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat.Immunol.*, v. 11, n. 10, p. 889-896, 2010

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, v. 25, n. 6, p. 280-288, 2004

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

BYSTROM, J.; WRAY, J. A.; SUGDEN, M. C.; HOLNESS, M. J.; SWALES, K. E.; WARNER, T. D.; EDIN, M. L.; ZELDIN, D. C.; GILROY, D. W.; BISHOP-BAILEY, D. Endogenous epoxygenases are modulators of monocyte/macrophage activity. *PLoS.One.*, v. 6, n. 10, p. e26591-2011

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, 2003

CATRINA, A. I.; JOSHUA, V.; KLARESKOG, L.; MALMSTROM, V. Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis. *Immunol.Rev.*, v. 269, n. 1, p. 162-174, 2016

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

CHAPPELL, M. C. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and absolute? *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 310, n. 2, p. H137-H152, 2016

CHEN, L. J.; XU, Y. L.; SONG, B.; YU, H. M.; OUDIT, G. Y.; XU, R.; ZHANG, Z. Z.; JIN, H. Y.; CHANG, Q.; ZHU, D. L.; ZHONG, J. C. Angiotensin-converting enzyme 2 ameliorates renal fibrosis by blocking the activation of mTOR/ERK signaling in apolipoprotein E-deficient mice. *Peptides*, v. 79, n. 49-57, 2016

CHEN, P.; LI, J.; BARNES, J.; KOKKONEN, G. C.; LEE, J. C.; LIU, Y. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J.Immunol.*, v. 169, n. 11, p. 6408-6416, 2002

CHIANG, N.; SERHAN, C. N. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol Aspects Med.*, v. 2017

CHIANG, N.; SHINOHARA, M.; DALLI, J.; MIRAKAJ, V.; KIBI, M.; CHOI, A. M.; SERHAN, C. N. Inhaled carbon monoxide accelerates resolution of inflammation via unique proresolving mediator-heme oxygenase-1 circuits. *J.Immunol.*, v. 190, n. 12, p. 6378-6388, 2013

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, 2008

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

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

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, 2010c

DALLI, J.; SERHAN, C. Macrophage Proresolving Mediators-the When and Where. *Microbiol.Spectr.*, v. 4, n. 3, p. 2016

DALLI, J.; SERHAN, C. N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*, v. 120, n. 15, p. e60-e72, 2012

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

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

FELTENBERGER, J. D.; ANDRADE, J. M.; PARAISO, A.; BARROS, L. O.; FILHO, A. B.; SINISTERRA, R. D.; SOUSA, F. B.; GUIMARAES, A. L.; DE PAULA, A. M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; QURESHI, M.; DOS SANTOS, R. A.; SANTOS, S. H. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Hypertension*, v. 62, n. 2, p. 324-330, 2013

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.; SMITH, R. D.; BROSNIHAN, B.; CHAPPELL, M. C.; CAMPESE, V. M.; VESTERQVIST, O.; LIAO, W. C.; RUDDY, M. C.; GRIM, C. E. Effects of omapatrilat on the renin-angiotensin system in salt-sensitive hypertension. *Am.J.Hypertens.*, v. 15, n. 6, p. 557-564, 2002

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.; 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

FORTE, B. L.; SLOSKY, L. M.; ZHANG, H.; ARNOLD, M. R.; STAATZ, W. D.; HAY, M.; LARGENT-MILNES, T. M.; VANDERAH, T. W. Angiotensin-(1-7)/Mas receptor as an antinociceptive agent in cancer-induced bone pain. *Pain*, v. 157, n. 12, p. 2709-2721, 2016

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

GAUTIER, E. L.; IVANOV, S.; LESNIK, P.; RANDOLPH, G. J. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood*, v. 122, n. 15, p. 2714-2722, 2013

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

GONG, J.; LIU, H.; WU, J.; QI, H.; WU, Z. Y.; SHU, H. Q.; LI, H. B.; CHEN, L.; WANG, Y. X.; LI, B.; TANG, M.; JI, Y. D.; YUAN, S. Y.; YAO, S. L.; SHANG, Y. MARESIN 1 PREVENTS LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED NEUTROPHIL SURVIVAL AND ACCELERATES RESOLUTION OF ACUTE LUNG INJURY. *Shock*, v. 44, n. 4, p. 371-380, 2015

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

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.*, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010

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

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

HO, P. C.; SAVILLE, D. J.; WANWIMOLRUK, S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J.Pharm.Pharm.Sci.*, v. 4, n. 3, p. 217-227, 2001

JASIN, H. E. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J.Orthop.Sci.*, v. 5, n. 2, p. 178-181, 2000

KEHOE, K.; GIELIS, J. F.; VLIEGEN, G.; VAN, Elzen R.; VERKERK, R.; DRIESSENS, E.; DOMEN, A.; LAMBEIR, A. M.; MAES, L.; COS, P.; DE, Meester, I; VAN SCHIL, P. E. Dysregulation of the renin-angiotensin system during lung ischemia-reperfusion injury. *Exp.Lung Res.*, v. 42, n. 6, p. 277-285, 2016

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

KORNS, D.; FRASCH, S. C.; FERNANDEZ-BOYANAPALLI, R.; HENSON, P. M.; BRATTON, D. L. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol.*, v. 2, n. 57-2011

LAHORTE, C. M.; VANDERHEYDEN, J. L.; STEINMETZ, N.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R. A.; SLEGGERS, G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging*, v. 31, n. 6, p. 887-919, 2004

LI, W.; LI, J.; HAO, P.; CHEN, W.; MENG, X.; LI, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; YANG, J. Imbalance between angiotensin II and angiotensin-(1-7) in human coronary atherosclerosis. *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.*, v. 17, n. 3, p. 2016a

LI, Y.; ZENG, Z.; CAO, Y.; LIU, Y.; PING, F.; LIANG, M.; XUE, Y.; XI, C.; ZHOU, M.; JIANG, W. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *Sci.Rep.*, v. 6, n. 27911-2016b

LIANG, Y. Y.; ARNOLD, T.; MICHLMAYR, A.; RAINPRECHT, D.; PERTICEVIC, B.; SPITTLER, A.; OEHLER, R. Serum-dependent processing of late apoptotic cells for enhanced efferocytosis. *Cell Death.Dis.*, v. 5, n. e1264-2014

LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv.Immunol.*, v. 120, n. 163-184, 2013

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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

MADERNA, P.; YONA, S.; PERRETTI, M.; GODSON, C. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *J.Immunol.*, v. 174, n. 6, p. 3727-3733, 2005

MAGALHAES, G. S.; RODRIGUES-MACHADO, M. G.; MOTTA-SANTOS, D.; ALENINA, N.; BADER, M.; SANTOS, R. A.; BARCELOS, L. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Chronic allergic pulmonary inflammation is aggravated in angiotensin-(1-7) Mas receptor knockout mice. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 311, n. 6, p. L1141-L1148, 2016

MAGALHAES, G. S.; RODRIGUES-MACHADO, M. G.; MOTTA-SANTOS, D.; SILVA, A. R.; CALIARI, M. V.; PRATA, L. O.; ABREU, S. C.; ROCCO, P. R.; BARCELOS, L. S.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *Br.J.Pharmacol.*, v. 172, n. 9, p. 2330-2342, 2015

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.*, v. 23, n. 4, p. 344-346, 2005

MARQUES, F. D.; FERREIRA, A. J.; SINISTERRA, R. D.; JACOBY, B. A.; SOUSA, F. B.; CALIARI, M. V.; SILVA, G. A.; MELO, M. B.; NADU, A. P.; SOUZA, L. E.; IRIGOYEN, M. C.; ALMEIDA, A. P.; SANTOS, R. A. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. *Hypertension*, v. 57, n. 3, p. 477-483, 2011

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

MARTIN, C. J.; PETERS, K. N.; BEHAR, S. M. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. *Curr.Opin.Microbiol.*, v. 17, n. 17-23, 2014

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.*, v. 13, n. 453-461, 2008

MATSUO, Y.; MIZOGUCHI, F.; SAITO, T.; KAWAHATA, K.; UEHA, S.; MATSUSHIMA, K.; INAGAKI, Y.; MIYASAKA, N.; KOHSAKA, H. Local fibroblast proliferation but not influx is responsible for synovial hyperplasia in a murine model of rheumatoid arthritis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 2016

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.*, v. 5, n. 4, p. a008656-2013

MCINNES, I. B.; BUCKLEY, C. D.; ISAACS, J. D. Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. *Nat.Rev.Rheumatol.*, v. 12, n. 1, p. 63-68, 2016

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 7, n. 6, p. 429-442, 2007

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

MICHELWSKA, S.; DRANSFIELD, I.; MEGSON, I. L.; ROSSI, A. G. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB J.*, v. 23, n. 3, p. 844-854, 2009

MILLOT, E.; FILEP, J. G. Regulation of neutrophil survival/apoptosis by Mcl-1. *ScientificWorldJournal.*, v. 11, n. 1948-1962, 2011

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

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFkappaB system. *Wiley.Interdiscip.Rev.Syst.Biol.Med.*, v. 8, n. 3, p. 227-241, 2016

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

NEWSON, J.; STABLES, M.; KARRA, E.; ARCE-VARGAS, F.; QUEZADA, S.; MOTWANI, M.; MACK, M.; YONA, S.; AUDZEVICH, T.; GILROY, D. W. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*, v. 124, n. 11, p. 1748-1764, 2014

NISHIMURA, H. Angiotensin receptors--evolutionary overview and perspectives. *Comp Biochem. Physiol A Mol Integr. Physiol*, v. 128, n. 1, p. 11-30, 2001

ORTEGA-GOMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol. Med.*, v. 5, n. 5, p. 661-674, 2013

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

PEREZ, D. A.; VAGO, J. P.; ATHAYDE, R. M.; REIS, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P.; PINHO, V. Switching off key signaling survival molecules to switch on the resolution of inflammation. *Mediators. Inflamm.*, v. 2014, n. 829851-2014a

PEREZ, D. A.; VAGO, J. P.; ATHAYDE, R. M.; REIS, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; SOUSA, L. P.; PINHO, V. Switching off key signaling survival molecules to switch on the resolution of inflammation. *Mediators. Inflamm.*, v. 2014, n. 829851-2014b

PERRETTI, M.; COOPER, D.; DALLI, J.; NORLING, L. V. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, v. 13, n. 2, p. 87-99, 2017

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

POON, I. K.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death.Differ.*, v. 17, n. 3, p. 381-397, 2010

RAVICHANDRAN, K. S.; LORENZ, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 7, n. 12, p. 964-974, 2007

REGENHARDT, R. W.; MECCA, A. P.; DESLAND, F.; RITUCCI-CHINNI, P. F.; LUDIN, J. A.; GREENSTEIN, D.; BANUELOS, C.; BIZON, J. L.; REINHARD, M. K.; SUMNERS, C. Centrally administered angiotensin-(1-7) increases the survival of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Exp.Physiol*, v. 99, n. 2, p. 442-453, 2014

ROBERTS, C. A.; DICKINSON, A. K.; TAAMS, L. S. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.*, v. 6, n. 571-2015

RODRIGUES-MACHADO, M. G.; MAGALHAES, G. S.; CARDOSO, J. A.; KANGUSSU, L. M.; MURARI, A.; CALIARI, M. V.; OLIVEIRA, M. L.; CARA, D. C.; NOVIELLO, M. L.; MARQUES, F. D.; PEREIRA, J. M.; LAUTNER, R. Q.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. AVE 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma. *Br.J.Pharmacol.*, v. 170, n. 4, p. 835-846, 2013

ROSSOL, M.; HEINE, H.; MEUSCH, U.; QUANDT, D.; KLEIN, C.; SWEET, M. J.; HAUSCHILDT, S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev.Immunol.*, v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011

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

RUSSO, R. C.; GUABIRABA, R.; GARCIA, C. C.; BARCELOS, L. S.; ROFFE, E.; SOUZA, A. L.; AMARAL, F. A.; CISALPINO, D.; CASSALI, G. D.; DONI, A.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, M. M. Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, v. 40, n. 4, p. 410-421, 2009

SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; CHAPPELL, M. C.; PESQUERO, J.; CHERNICKY, C. L.; GREENE, L. J.; FERRARIO, C. M. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 1153-1157, 1988

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.; FERREIRA, A. J.; VERANO-BRAGA, T.; BADER, M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J.Endocrinol.*, v. 216, n. 2, p. R1-R17, 2013

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, 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, 2003c

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

SCHIAVONE, M. T.; SANTOS, R. A.; BROSNIHAN, K. B.; KHOSLA, M. C.; FERRARIO, C. M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 85, n. 11, p. 4095-4098, 1988

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.; DALLI, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin.Immunol.*, v. 27, n. 3, p. 200-215, 2015

SHENOY, V.; FERREIRA, A. J.; QI, Y.; FRAGA-SILVA, R. A.; DIEZ-FREIRE, C.; DOOIES, A.; JUN, J. Y.; SRIRAMULA, S.; MARIAPPAN, N.; POURANG, D.; VENUGOPAL, C. S.; FRANCIS, J.; REUDELHUBER, T.; SANTOS, R. A.; PATEL, J. M.; RAIZADA, M. K.; KATOVICH, M. J. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 182, n. 8, p. 1065-1072, 2010

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best.Pract.Res.Clin.Anaesthesiol.*, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004

SILVEIRA, K. D.; BARROSO, L. C.; VIEIRA, A. T.; CISALPINO, D.; LIMA, C. X.; BADER, M.; ARANTES, R. M.; DOS SANTOS, R. A.; SIMOES-E-SILVA AC; TEIXEIRA, M. M. Beneficial effects of the activation of the angiotensin-(1-7) MAS receptor in a murine model of adriamycin-induced nephropathy. *PLoS.One.*, v. 8, n. 6, p. e66082-2013a

SILVEIRA, K. D.; COELHO, F. M.; VIEIRA, A. T.; BARROSO, L. C.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; COSTA, V. V.; SOUSA, L. F.; OLIVEIRA, M. L.; BADER, M.; SILVA, T. A.; SANTOS, R. A.; SILVA, A. C.; TEIXEIRA, M. M. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. *Peptides*, v. 46, n. 53-63, 2013b

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

SIMOES E SILVA AC; SILVEIRA, K. D.; FERREIRA, A. J.; TEIXEIRA, M. M. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br.J.Pharmacol.*, v. 169, n. 3, p. 477-492, 2013

SIMOES E SILVA AC; TEIXEIRA, M. M. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. *Pharmacol.Res.*, v. 107, n. 154-162, 2016

SOUSA, L. P.; CARMO, A. F.; REZENDE, B. M.; LOPES, F.; SILVA, D. M.; ALESSANDRI, A. L.; BONJARDIM, C. A.; ROSSI, A. G.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem.Pharmacol.*, v. 78, n. 4, p. 396-405, 2009

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, 2010

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

TAO, L.; QIU, Y.; FU, X.; LIN, R.; LEI, C.; WANG, J.; LEI, B. Angiotensin-converting enzyme 2 activator diminazene acetate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting MAPK and NF-kappaB pathways in human retinal pigment epithelium. *J.Neuroinflammation.*, v. 13, n. 35-2016

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, 2012

VAN DER SANDE, N. G.; DORRESTEIJN, J. A.; VISSEREN, F. L.; DWYER, J. P.; BLANKESTIJN, P. J.; VAN DER GRAAF, Y.; HEERSPINK, H. L. Individualized prediction of the effect of angiotensin receptor blockade on renal and cardiovascular outcomes in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Obes.Metab*, v. 2016

VERSTAPPEN, S. M. Rheumatoid arthritis and work: The impact of rheumatoid arthritis on absenteeism and presenteeism. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.*, v. 29, n. 3, p. 495-511, 2015

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

WOODWORTH, T. G.; DEN BROEDER, A. A. Treating to target in established rheumatoid arthritis: Challenges and opportunities in an era of novel targeted therapies and biosimilars. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.*, v. 29, n. 4-5, p. 543-549, 2015

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

ZHAO, Y.; QIN, Y.; LIU, T.; HAO, D. Chronic nerve injury-induced Mas receptor expression in dorsal root ganglion neurons alleviates neuropathic pain. *Exp.Ther.Med.*, v. 10, n. 6, p. 2384-2388, 2015

## ANEXO 1

## Mas and Inflammation

Livia Corrêa Barroso<sup>a</sup>, Kátia Daniella Silveira<sup>a</sup>, Mauro Martins Teixeira<sup>a</sup>, Ana Cristina Simões Silva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, <sup>b</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, <sup>c</sup>Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation—LIM, Federal University of Minas Gerais—UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### INTRODUCTION

The actions of the renin-angiotensin system (RAS) extend far beyond the regulation of the blood pressure and hydroelectrolyte balance.<sup>1,2</sup> The classical axis of the RAS, composed by angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin (Ang) II, and Ang receptor type 1 (AT<sub>1</sub>), is also known to have an important role in inflammation.<sup>3,5</sup> Many studies have shown that Ang II, acting via the AT<sub>1</sub> receptor, activates several cell functions and molecular signaling pathways related to tissue injury, inflammation, and fibrosis, including calcium mobilization, free radical generation, activation of protein kinases and nuclear transcription factors, recruitment of inflammatory cells, adhesion of monocytes and neutrophils to endothelial and mesangial cells, upregulation of adhesion molecules and stimulation of expression, and synthesis and release of cytokines.<sup>6,11</sup> On the other hand, the counterregulatory axis of the RAS, composed of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), Ang-(1-7), and Mas receptor, may also influence inflammatory responses. Ang-(1-7), acting via receptor Mas, inhibits leukocyte migration, cytokine expression and release, macrophage activation, and fibrogenic pathways.<sup>10,12–20</sup>

In this chapter, we summarize recent findings on the anti-inflammatory and antifibrogenic role of ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis in the context of experimental human diseases.

### ACE2/ANG-(1-7)/MAS AXIS IN CYTOKINE REGULATION AND CELLULAR RECRUITMENT

#### Cytokine Regulation

The activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis reduced the expression of proinflammatory and fibrogenic cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ ) and increased the expression of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, in a model of pulmonary hypertension.<sup>21,22</sup> In a murine model of asthma, Ang-(1-7) also attenuated leukocyte influx in airways spaces, perivascular and peribronchial inflammation, fibrosis, and goblet cell hyper-/metaplasia.<sup>13</sup> Using the same experimental model of asthma, Rodrigues-Machado et al. showed that an oral agonist of the Mas receptor, compound AVE 0991, prevented airway and pulmonary vascular remodeling, reduced IL-5 levels, and increased IL-10 levels in the bronchoalveolar fluid.<sup>24</sup>

In renal tissue, Barroso et al. showed that AVE 0991 reduced the circulating levels of the chemokine CXCL1 leading to less neutrophil accumulation in a murine model of renal ischemia and reperfusion.<sup>15</sup> More recently, Silveira et al. showed that oral administration of AVE 0991 improved renal function parameters and histological alterations and reduced urinary protein loss and renal levels of TGF- $\beta$  in a model of adriamycin-induced nephropathy.<sup>23</sup> Ang(1-7) was also able to reduce oxidative stress; inflammatory markers, including IL-6, TNF- $\alpha$ , and endothelin (ED)-1; and renal fibrosis in Zucker diabetic fatty rats.<sup>26</sup>

Similarly, mice with genetic deletion of ACE2 had increased numbers of neutrophils, macrophages, and T cells and high levels of IL-1 and MCP-1.<sup>23,28</sup> In addition, the absence of ACE2 resulted in higher mRNA expression of MCP-1, IL-1 $\beta$ , and IL-6 and more aortic inflammation in response to Ang II infusion.<sup>29</sup> Accordingly, Souza et al. recently showed that Mas knockout mice produced higher levels of cytokines and exhibited higher mortality rates in response to lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia, whereas the treatment with Ang-(1-7) in LPS-induced wild-type animals inhibited the production of IL-6, IL-12, and CXCL1 and reduced hypothermia, thereby protecting mice from the fatal consequences of endotoxemia.<sup>20</sup>

In the brain, infusion of Ang-(1-7) into the lateral ventricle of Sprague-Dawley rats subjected to permanent middle cerebral artery occlusion was associated with local decrease of oxidative stress, suppression of NF- $\kappa$ B activity, and reduction of proinflammatory cytokines.<sup>14</sup> Accordingly, it has been reported that the overexpression of ACE2 in paraventricular nucleus attenuated Ang II-induced expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6.<sup>17</sup> In a rat model of cerebral ischemic stroke, Regenhardt et al.<sup>20</sup> showed that Ang-(1-7) reduces gene expression of IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , myeloperoxidase (MPO), MCP-1, chemokine receptor type 4 (CXCR4), and chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12).

Genetic ACE2 deficiency increased vascular inflammation and atherosclerosis in ApoE knockout mouse by increasing gene expression of vascular cell adhesion molecules (VCAM), cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinases (MMPs).<sup>19</sup> Accordingly, Jin and colleagues showed that loss of ACE2 increases Ang II-induced mRNA expression of inflammatory cytokines and chemokines in the aorta.<sup>19</sup> Sukumaran and coworkers found that angiotensin receptor blockers (ARBs) increased ACE2, Ang-(1-7), and Mas expression in line with a reduction of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6) and an elevation of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, in a rat model of autoimmune myocarditis.<sup>16,21</sup> Al-Maghrebi et al. also showed that treatment with Ang-(1-7) prevents cardiac dysfunction in spontaneously hypertensive rats and reduces NF- $\kappa$ B activity and the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, Nalp12, and caspase 1 in response to acute ischemia-reperfusion injury.<sup>22</sup>

### Cellular Recruitment and Function

Ang II contributes significantly to the process of leukocyte migration *in vivo* by modifying the interaction of leukocytes with endothelial cells, whereas experimental findings support an opposite effect of ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis.<sup>16,23–25</sup> The administration of Ang-(1-7) or AVE 0991 decreased rolling and adhesion of leukocytes to the microvascular endothelium, neutrophil influx, hypernociception, and histological lesions at inflamed joints in a mouse model of antigen-induced arthritis.<sup>16</sup>

A few studies have reported that the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis decreases macrophage function.<sup>18,19</sup> Mas transcripts are upregulated in macrophages after LPS exposure, and Ang-(1-7) was able to regulate mRNA levels of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and to decrease the phosphorylation levels of Src kinases.<sup>18</sup> Macrophages isolated from the bone marrow of ACE2 knockout mice have increased expression of VCAM-1 and high levels of TNF- $\alpha$ , CCL2, and IL-6 following LPS administration.<sup>18</sup> Moreover, the overexpression of ACE2 inhibited the expression of MCP-1 induced by Ang II in macrophages, and this effect seemed to be mediated by increased levels of Ang-(1-7).<sup>28</sup>

## ACE2/ANG-(1-7)/MAS AXIS AND FIBROGENIC PATHWAYS

### Tissue Fibrosis

Fibrogenic and proliferative actions of the ACE/Ang II/AT<sub>1</sub> axis have been largely recognized, whereas many studies supported an antifibrogenic and antiproliferative role for the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis.<sup>29–42</sup>

Grobe et al. showed that the administration of Ang-(1-7) prevented cardiac fibrosis induced by Ang II in Sprague-Dawley rats.<sup>43</sup> In trained two-kidney one-clip hypertensive rats, the administration of Ang-(1-7) decreased fibrosis, and this effect was accompanied by upregulation of Mas, AT<sub>2</sub>, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in the heart.<sup>44</sup> ACE2-deficient mice, which have lower levels of Ang-(1-7), exhibited early cardiac hypertrophy<sup>45</sup> and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction.<sup>44,46</sup> ACE2 deficiency also resulted in progressive cardiac fibrosis in models of aging and cardiac pressure overload,<sup>48,50</sup> while ACE2 overexpression reversed cardiac hypertrophy and fibrosis in mice.<sup>51,52</sup> Neonatal and adult Mas-deficient mice showed significantly higher levels of collagen types I and III and fibronectin and reduced levels of collagen IV in both the right ventricle and the AV valves.<sup>53,54</sup>

ACE2 mRNA expression and enzymatic activity were decreased in human idiopathic pulmonary fibrosis and in rat and mouse models of lung fibrosis induced by bleomycin.<sup>55</sup> Blockade of ACE2 in mice increased pulmonary levels of Ang II and enhanced bleomycin-induced lung fibrosis through a mechanism dependent on AT<sub>1</sub> receptors.<sup>55</sup> Similarly, the loss of ACE2 activity worsened liver fibrosis in chronic liver injury models,<sup>56</sup> and Mas deletion was associated with severe liver steatosis.<sup>57</sup>

### TGF- $\beta$ Signaling and Other Fibrogenic Pathways

The ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis modifies the expression of TGF- $\beta$  and of key components of the TGF- $\beta$  pathway.<sup>22,41,45,58,59</sup> Ang-(1-7) decreased TGF- $\beta$  mRNA levels in cultured cardiac fibroblasts,<sup>40</sup> reduced plasma levels of TGF- $\beta$  in rat model of myocardial infarction,<sup>45</sup> and improved vascular remodeling via downregulation of TGF- $\beta$  and inhibition of the Smad2 pathway.<sup>59</sup> Ang-(1-7) was able to counteract the signaling induced by Ang II in skeletal muscle by local decreasing of the

expression and activity of TGF- $\beta$  and by preventing early and late phosphorylation of p38 MAPK, Smad-2 phosphorylation, and Smad-4 nuclear translocation.<sup>42</sup> The administration of Ang-(1-7) protected damaged tissues in skeletal muscle of a Duchenne muscular dystrophy mouse model, improved muscle function, and decreased local fibrosis by the inhibition of TGF- $\beta$  Smad 2/3 signaling.<sup>38</sup>

Ang-(1-7) also played a protective role in hepatic fibrosis since the pharmacological blockade of Mas receptor aggravated liver fibrosis with a significant elevation in TGF- $\beta$  levels.<sup>43</sup> The oral formulation including Ang-(1-7) in hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin improved diastolic and systolic functions and reduced the expression of TGF- $\beta$  and collagen type I in a rat model of myocardial infarction.<sup>39</sup> Intratracheal administration of lentiviruses expressing Ang-(1-7) or ACE2 induced overexpression of Ang-(1-7) in lungs and reduced lung fibrosis and TGF- $\beta$  levels in rats given bleomycin.<sup>42</sup> Oral administration of Ang-(1-7) reduced fibrosis index, TGF- $\beta$  expression, and Smad2/3 activation in lung injury induced by LPS.<sup>41</sup>

ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis also regulates TGF- $\beta$ -independent fibrogenic pathways. The molecular mechanisms that underlie the antiproliferative actions of Ang-(1-7) include stimulation of prostaglandins and cAMP production and inhibition of MAP kinases.<sup>45</sup> Ang-(1-7) caused inhibition of growth of human lung cells via reduction in serum-stimulated phosphorylation of ERK1 and ERK2.<sup>39</sup> In cultured vascular smooth muscle cells, Ang-(1-7) inhibited Ang II-activated protein kinase C and MAP kinases.<sup>44</sup> Similarly, in cultured human endothelial cells, Ang-(1-7) inhibited Ang II-stimulated phosphorylation of c-Src and ERK 1/2 and blunted Ang II-stimulated NADPH oxidase activity.<sup>42</sup> The treatment of cardiac fibroblasts with Ang-(1-7) reduced Ang II- or ET-1-stimulated increase in phospho-ERK1 and phospho-ERK2.<sup>43</sup> Moreover, Ang-(1-7) blocked the increase of cyclooxygenase 2 and prostaglandin synthase mRNAs in cardiac fibroblasts incubated with ET-1.<sup>43</sup> Treatment of cardiac fibroblasts with recombinant human ACE2 or ACE2 activators reduced collagen production and Ang II-mediated increase in phospho-MAP kinases.<sup>44</sup> Ang-(1-7) was able to inhibit the gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2, and GFAP and activation of NF- $\kappa$ B and MAP kinases in primary cultures of rat astrocytes submitted to radiation.<sup>45</sup> Oral administration of Ang-(1-7) in rats receiving a high-fat diet prevented obesity and decreased liver proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) by the downregulation of resistin/Toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B pathway.<sup>46</sup>

ACE2 deficiency increased tissue fibrosis, collagen accumulation, remodeling, hypertrophy, and macrophage inflammatory protein 1a (MIP1a) in the aorta and in cardiomyocytes of ACE2 knockout mice treated with Ang II. Accordingly, Mas-deficient mice also exhibited impairment of heart and renal function associated with changes in collagen expression toward a profibrotic profile.<sup>47,48</sup>

## CONCLUDING REMARKS

Activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis decreases inflammatory cell function and fibrogenesis in diverse models of human diseases. Further studies are clearly needed to elucidate the mechanisms by which this RAS axis modulates inflammation and fibrosis. Nevertheless, current knowledge supports the possibility that drugs that mimic or enhance the function of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis may be beneficial for the treatment of human diseases with inflammatory and fibrotic components.

## REFERENCES

1. Chappell MC. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Comp Physiol* 2012;2:2733–52.
2. Nabab YN, Mates T, Estelles R, Mata M, Zagorski J, Sarai H, et al. Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation* 2004;110:3581–6.
3. Ferrario CM, Smith RD, Bromberg B, Chappell MC, Campese VM, Vestarqvist O, et al. Effects of omapatrilat on the renin-angiotensin system in salt-sensitive hypertension. *Am J Hypertens* 2002;15:557–64.
4. Simoes e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Tolosa MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol* 2013;169:477–92.
5. Chappell MC. Angiotensin-converting enzyme 2 autoantibodies: further evidence for a role of the renin-angiotensin system in inflammation. *Arthritis Res Ther* 2010;12:128.
6. Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Barros LC, Queiroz-Junior CM, Costa VV, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. *Peptides* 2013;46:53–63.
7. Capellini LS, Montecucco F, Mach F, Stergachis N, Santos RA, de Silva RF. Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. *Curr Pharm Des* 2012;18:963–70.
8. Ma TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol* 2010;160:1273–92.
9. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ripstein M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensin. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:321–9.
10. Sakumura Y, Vostrovskis PT, Garsoway N, Lakshmanan AP, Yamaguchi K, Ma M, et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE2/Ang 1-7/Mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sci* 2012;90:289–300.

Research Article

## Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout

*Izabela Galvão<sup>1</sup>, Juliana P. Vago<sup>1,2</sup>, Livia C. Barroso<sup>1</sup>,  
Luciana P. Tavares<sup>1</sup>, Celso M. Queiroz-Junior<sup>2</sup>, Vivian V. Costa<sup>1</sup>,  
Fernanda S. Carneiro<sup>4</sup>, Tatiana P. Ferreira<sup>3</sup>, Patricia M. R. Silva<sup>3</sup>,  
Flávio A. Amaral<sup>1</sup>, Lirlândia P. Sousa<sup>\*1,4</sup> and Mauro M. Teixeira<sup>\*1</sup>*

<sup>1</sup> Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

## Beneficial Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Mas Receptor in a Murine Model of Adriamycin-Induced Nephropathy

Kátia Daniela Silveira<sup>1</sup>, Lívia Corrêa Barroso<sup>1</sup>, Angélica Thomáz Vieira<sup>1</sup>, Daniel Cisalpino<sup>1</sup>, Cristiano Xavier Lima<sup>1,3</sup>, Michael Bader<sup>5</sup>, Rosa Maria Esteves Arantes<sup>2</sup>, Robson Augusto Souza dos Santos<sup>4</sup>, Ana Cristina Simões-e-Silva<sup>3,4,5</sup>, Mauro Martins Teixeira<sup>1,3,4,5</sup>

**1** Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Departamento de Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin Buch, Germany

### Abstract

Angiotensin-(1–7) [Ang-(1–7)] is a biologically active heptapeptide that may counterbalance the physiological actions of angiotensin II (Ang II) within the renin-angiotensin system (RAS). Here, we evaluated whether activation of the Mas receptor with the oral agonist, AVE 0991, would have renoprotective effects in a model of adriamycin (ADR)-induced nephropathy. We also evaluated whether the Mas receptor contributed for the protective effects of treatment with AT<sub>1</sub> receptor blockers. ADR (10 mg/kg) induced significant renal injury and dysfunction that was maximal at day 14 after injection. Treatment with the Mas receptor agonist AVE 0991 improved renal function parameters, reduced urinary protein loss and attenuated histological changes. Renoprotection was associated with reduction in urinary levels of TGF- $\beta$ . Similar renoprotection was observed after treatment with the AT<sub>1</sub> receptor antagonist, Losartan. AT<sub>1</sub> and Mas receptor mRNA levels dropped after ADR administration and treatment with losartan reestablished the expression of Mas receptor and increased the expression of ACE2. ADR-induced nephropathy was similar in wild type (*Mas*<sup>+/+</sup>) and Mas knockout (*Mas*<sup>-/-</sup>) mice, suggesting there was no endogenous role for Mas receptor activation. However, treatment with Losartan was able to reduce renal injury only in *Mas*<sup>+/+</sup>, but not in *Mas*<sup>-/-</sup> mice. Therefore, these findings suggest that exogenous activation of the Mas receptor protects from ADR-induced nephropathy and contributes to the beneficial effects of AT<sub>1</sub> receptor blockade. Medications which target specifically the ACE2/Ang-(1–7)/Mas axis may offer new therapeutic opportunities to treat human nephropathies.

**Citation:** Silveira KD, Barroso LC, Vieira AT, Cisalpino D, Lima CX, et al. (2013) Beneficial Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Mas Receptor in a Murine Model of Adriamycin-Induced Nephropathy. PLoS ONE 8(6): e66082. doi:10.1371/journal.pone.0066082

**Editor:** Jean-Claude Dussault, INSERM, France

**Received:** July 11, 2012; **Accepted:** May 6, 2013; **Published:** June 7, 2013

**Copyright:** © 2013 Silveira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the European Union's Sixth Framework Programme (INNOCHEM, project grant LSHB-CT-2005-518167) and the European Community's Seventh Framework Programme [FP7-2007-2013] under grant agreement HEALTH-F4-2011-281608. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mmtex@icb.ufmg.br (MMT); ana@medicina.ufmg.br (ACSS)

These authors contributed equally to this work.

## ANEXO 4



### Peptides

Volume 46, August 2013, Pages 53–63



## Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis

Kátia D. Silveira<sup>a, b</sup>, Fernanda M. Coelho<sup>a</sup>, Angélica T. Vieira<sup>a</sup>, Lívia C. Barroso<sup>a</sup>, Celso M. Queiroz-Junior<sup>a, c</sup>, Vívian V. Costa<sup>a</sup>, Larissa F.C. Sousa<sup>a</sup>, Marilene L. Oliveira<sup>b</sup>, Michael Bader<sup>e</sup>, Tarcila A. Silva<sup>a, c</sup>,  
✉ **Show more**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.05.012>

Get rights and content