

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

ISABELLA ZAIDAN MOREIRA

**PAPEL DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES**

Belo Horizonte

2019

ISABELLA Z Aidan Moreira

**PAPeL DA ANGIOTENSINA-(1-7) NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

COORIENTADORA: Dra. Izabela Galvão

Belo Horizonte

2019



FOLHA DE APROVAÇÃO

Papel da Angiotensina-(1-7) na migração de células mononucleares.

ISABELLA ZAIDAN MOREIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Profa. Lirlândia Pires de Sousa - Orientador
UFMG


Profa. Izabela Galvão - Co-orientadora
UFMG


Profa. Luciola da Silva Barcelos
UFMG


Profa. Michelle Adriane Amâncio Sugimoto
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram no meu potencial e me incentivaram a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a vida e capacidade de lutar pelos meus sonhos.

Minha eterna gratidão à minha orientadora, professora Lirlândia, por todo apoio, pelo incentivo e acolhida. Agradeço por acreditar no meu potencial e pela confiança depositada em mim nestes dois anos de trabalho.

Agradeço também ao professor Dr. Mauro Martins Teixeira pela colaboração com este projeto, tanto científica como financeira.

À equipe do laboratório, que foram minhas mãos em muitos dos experimentos realizados: Izabela Galvão, Kátia, Larissa, Michelle, Grazi e Lívia. A forma como trabalhamos em equipe tornou o processo bem mais prazeroso.

Aos professores do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia e do Instituto de Ciências Biológicas que sempre estavam dispostos a colaborar.

Aos meus pais, Carlos e Patrícia, minha irmã, Marcella, e meu namorado, Pedro, por todo suporte e motivação. Vocês foram luz e inspiração pra eu seguir em frente.

RESUMO

A resolução da inflamação é um processo altamente regulado e ativo, caracterizado por alguns eventos chave, como a apoptose de neutrófilos seguido de sua remoção por macrófagos - processo chamado eferocitose. A migração não flogística de macrófagos contribui sobremaneira para o processo de *clearance* e consequente resolução da inflamação. Recentemente foi demonstrado que a Angiotensina-(1-7), um metabólito do sistema Renina-Angiotensina, apresenta os efeitos pró-resolutivos de indução da apoptose de neutrófilos e remoção dos corpos apoptóticos por eferocitose. No presente estudo, investigamos o papel da Ang-(1-7) na indução da migração de células mononucleares humanas (monócitos) e murinas (macrófagos RAW 264.7 e macrófagos derivados da medula óssea- BMDMs) e o envolvimento da via MEK/ERK e dos receptores Mas e CCR2 neste processo, por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. Ang-(1-7) induziu a migração de monócitos humanos e macrófagos murinos em placas de transwell. Utilizando-se antagonistas farmacológicos seletivos para os receptores CCR2 (RS504393) e Mas (A779) na linhagem de células RAW, bem como BMDMs de animais deficientes em CCR2, observou-se que migração induzida por Ang-(1-7) foi dependente dos receptores Mas e CCR2. A inibição da via MEK/ERK, importante para migração de células mononucleares, utilizando dois diferentes inibidores (Selumetinibe e U0126), impediu a quimiotaxia de macrófagos murinos induzida por Ang-(1-7). Em camundongos BALB/c a injeção intra-articular e intrapleural de Ang-(1-7) induziu um influxo de células mononucleares para as respectivas cavidades, associado ao aumento dos níveis de CCL2. Os leucócitos recrutados para a cavidade pleural após a injeção de Ang-(1-7) foram principalmente monócitos Ly6C⁺/F4/80⁻, os quais foram caracterizados fenotipicamente por citometria de fluxo. De acordo com os dados obtidos *in vitro*, experimentos conduzidos *in vivo* mostram que o pré-tratamento com antagonistas seletivos dos receptores CCR2 (RS504393) e Mas (A779) e da via MER/ERK (U0126), diminuíram a migração de células mononucleares para a pleura dos camundongos. Avaliamos também o efeito da inibição do receptor Mas (A779) na resolução da pleurisia induzida por LPS e observamos que o a injeção de A779 durante o curso da inflamação preveniu a resolução que ocorre espontaneamente no tempo de 48h neste modelo experimental, caracterizando assim um comprometimento do processo

de resolução. Finalmente, a participação do receptor Mas foi também avaliada utilizando-se animais WT e MasR^{-/-}. Nossos resultados mostram que a pleurisia foi exacerbada nos animais MasR^{-/-} (marcada por maior recrutamento de neutrófilos no pico da inflamação – 8 h), reforçando a participação do eixo Ang-(1-7)/MasR nesse modelo experimental. Em conjunto, os resultados mostram que a Ang-(1-7) é capaz de recrutar células mononucleares de maneira dependente dos receptores Mas e CCR2 e da via MEK/ERK1/2. Somando-se às já demonstradas propriedades indutoras de apoptose e de eferocitose da Ang-(1-7), foi mostrado aqui o efeito indutor do recrutamento de células mononucleares, o qual pode contribuir para as propriedades pró-resolutivas deste peptídeo.

Palavras chave: Sistema Renina-Angiotensina, Angiotensina-(1-7), resolução da resposta inflamatória, migração celular.

ABSTRACT

The resolution of inflammation is an active process highly regulated and characterized by key events such as neutrophil apoptosis followed by its removal by macrophages - a process named efferocytosis. The nonphlogistic migration of macrophages contributes greatly to the clearance of apoptotic cells and consequently resolution of inflammation. It has been shown that Angiotensin-(1-7), a metabolite of the Renin-Angiotensin system, has proresolving actions, such as induction of neutrophil apoptosis and removal of apoptotic bodies by efferocytosis. In this study, we have investigated the role of Ang-(1-7) to inducing the migration of human (monocytes) and murine macrophages (RAW 264.7 and Bone Marrow Derived Macrophages - BMDMs) and the involvement of the MEK/ERK pathway and the receptors Mas and CCR2 in this process, by applying *in vitro* and *in vivo* studies. Ang-(1-7) induced migration of human monocytes and murine macrophages in transwell plates. By using selective pharmacological antagonists of CCR2 (RS504393) and Mas (A779) receptors in RAW264.7 macrophages as well as BMDMs from CCR2^{-/-} mice, it was found that Ang-(1-7)-induced migration was dependent on Mas and CCR2. Inhibition of the MEK/ERK pathway, which is an important pathway for mononuclear cell migration, using two different inhibitors (Selumetinib and U0126), prevented Ang-(1-7)-induced chemotaxis of murine macrophages. In BALB/c mice, intra-articular and intrapleural injection of Ang-(1-7) induced an influx of mononuclear cells into the respective cavities, associated with increased CCL2 levels. The leukocytes recruited to the pleural cavity after Ang-(1-7) injection were mainly composed by monocytes (Ly6C⁺/F4/80⁻) as ascertained by flow cytometry. Akin to the *in vitro* data, pretreatment of mice using antagonists of CCR2 and MasR (RS504393 or A779), or the inhibition of the MEK/ERK pathway with U0126, compromised the mononuclear cell migration to the pleural cavity after Ang-(1-7) injection. We also evaluated the effect of A779 on natural resolution of LPS-induced pleurisy and we found that inhibition of MasR in course of the LPS-inflammation hampers the spontaneous resolution that occurs at 48h time point, characterizing a compromised inflammation resolution. Finally, by using WT and MAS^{-/-} mice, we also have evaluated the role of MasR during LPS-induced inflammation. Our results show that pleurisy was exacerbated in MasR deficient

animals (marked by higher numbers of neutrophils at the peak of inflammation - 8h), reinforcing the participation of Ang-(1-7)/MasR axis during resolution of inflammation. Taken together, our results show that Ang-(1-7) is able to promote mononuclear cells recruitment in a manner dependent on the receptors Mas and CCR2 and of the MEK/ERK1/2 pathway. In addition to the Ang-(1-7)-inducing properties of apoptosis and efferocytosis, the no redundant Ang-(1-7)-inducing effect on mononuclear cell recruitment shown here, may contribute to the proresolving properties of this peptide.

Key words: Renin-Angiotensin System, Angiotensin-(1-7), resolution of the inflammatory response, cell migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: componentes da resposta inflamatória.	14
Figura 2: Resumo das interações que ocorrem entre leucócitos e células endoteliais durante a inflamação.	16
Figura 3: Esquema simplificado do sistema renina angiotensina (RAS).	19
Figura 4: Ang-(1-7) induz a migração de células mononucleares.	40
Figura 5: Efeito da Ang-(1-7) na quimiotaxia de neutrófilos humanos.	42
Figura 6: Efeito do receptor CCR2 na migração de macrófagos murinos induzida por Ang-(1-7).	43
Figura 7: Efeito do pré-tratamento com os inibidores de MEK/ERK, Selumetinibe e U0126, na migração de macrófagos induzida por Ang-(1-7)	44
Figura 8: Cinética do recrutamento de leucócitos <i>in vivo</i> após injeção de Ang-(1-7).	46
Figura 9: Perfil fenotípico dos leucócitos encontrados na pleura de animais desafiados com Ang-(1-7).	47
Figura 10: Efeito dos antagonistas de CCR2, RS504393, e do receptor Mas, A779, na migração induzida por Ang-(1-7).	48
Figura 11: Efeito do tratamento com o inibidor de MEK/ERK, U0126, na migração de células mononucleares induzida por Ang-(1-7) <i>in vivo</i>	49
Figura 12: Efeito do tratamento com o antagonista do receptor Mas, A779, na resolução da inflamação aguda natural.	50
Figura 13: Cinética de influxo de leucócitos em camundongos WT e Mas ^{-/-} após injeção de LPS.	51

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Estudos que avaliam a relevância de Ang-(1-7) e do receptor Mas no contexto de inflamação	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnxA1	Anexina A1
AMPA	Aminopectidase A
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
AMPM	Aminopectidase M
Ang	Angiotensina
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
AT1	Receptor tipo 1 para Angiotensina
AT2	Receptor tipo 2 para Angiotensina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina Bovina Sérica
CCR2	<i>Chemokine Receptor Type 2</i> - Receptor Tipo 2 de Quimiocina
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinases</i> - Cinase Dependente de Ciclina
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic acid</i> - Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético
DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i> – Padrões moleculares associados ao dano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECA 2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i> - Molécula de adesão intercelular
IRAP	<i>Insulin Regulated Aminopectidase</i> - Aminopectidase Regulada pela Insulina
IL-1 β	Interleucina1 Beta
IL-1R	Receptor de Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8/KC	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
INF- γ	Interferon Gama
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolissacarídeo
LXA4	Lipoxina A4
MAMP	<i>Microbe Associated Molecular Patterns</i> - Padrão Molecular

	Associado a Micro-organismo
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> – Proteínas Cinasas Ativadas por Mitógenos
MasR	Receptor para Angiotensina 1-7
MCP-1/CCL2	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> - Proteína Quimiotática de Monócitos1
MIP-2/CCL3	<i>Macrophage Inflammatory Protein-2</i> - Proteína Inflamatória de Macrófagos-2
Mres	Macrófago resolutivo
M1	Macrófago de perfil inflamatório
M2	Macrófago de perfil anti-inflamatório
NEP	<i>Neutral Endopeptidase</i> - Endopeptidase Neutra
NF- κ B	Fator Nuclear κ B
NLRs	Receptores de reconhecimento de padrões intracelulares <i>Nodlike</i>
NO	<i>Nitric oxide</i> - Óxido Nítrico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Tampão Fosfato Salina
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i> – Molécula de Adesão Plaqueta Célula Endotelial
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-cinase/Proteína cinase B ou Akt
PMN	Polimorfonuclear
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> - Células Mononucleares do Sangue Periférico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> - Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> – Meio Roswell Park Memorial Institute
RPR	Receptor de Renina/pró-renina
SBF	<i>Bovine Fetal Serum</i> - Soro Fetal Bovino
SPMs	<i>Specialized Pro-resolving Mediators</i> - Mediadores Pró-resolutivos Especializados
SRA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> - Fator de crescimento transformante Beta
Th1	Linfócito T <i>Helper</i> 1
TLRs	Receptores do Tipo <i>Toll</i>
TNF- α	<i>Necrosis Factor Alpha</i> – Fator de Necrose Tumoral Alfa
UTP	Uridina trifosfato
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> – Molécula de adesão de célula vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Inflamação.....	14
1.2 O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	18
1.2.1 Angiotensina-(1-7).....	20
1.3 Resolução da Inflamação	23
1.3.1 O papel dos macrófagos na progressão e resolução da resposta inflamatória	25
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Cultura de células e ensaios <i>in vitro</i>	31
4.1.1. Cultivo celular.....	31
4.1.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humano...	31
4.1.3. Isolamento de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)	31
4.1.5 Experimentos <i>in vitro</i> para avaliar a migração de mononucleares e neutrófilos	33
4.2. Determinação da expressão das quimiocinas CCL2 e CCL5 por ELISA	34
4.3. <i>Western Blot</i> para análise da ativação de ERK1/2 por fosforilação	34
4.3.1. Obtenção dos extratos protéicos	34
4.3.2. Quantificação dos extratos protéicos	35
4.3.3. Fracionamento eletroforético e transferência	35
4.3.4. <i>Imunoblot</i> e revelação	35
4.4 Animais.....	36
4.5. Migração de leucócitos na cavidade pleural induzida por Ang-(1-7).....	36
4.6. Análise do perfil fenotípico dos leucócitos recrutados para a pleura após a injeção de Ang-(1-7) por citometria de fluxo.....	37
4.7. Modelo murino de pleurisia induzida por LPS.....	37
4.8. Contagem total e diferencial de células	37
4.9. Análises estatísticas.....	38
5.1 - Ang-(1-7) induz quimiotaxia de monócitos humanos e macrófagos murinos dependente do receptor Mas.....	39
5.2 - Ang-(1-7) não induz quimiotaxia de neutrófilos humanos.....	40

5.3 - Ang-(1-7) induz quimiotaxia de macrófagos dependente de CCR2.....	42
5.4 - Ang-(1-7) induz migração de macrófagos de forma dependente da via MEK/ERK ...	43
5.5 - Ang-(1-7) induz a migração de leucócitos <i>in vivo</i>	45
5.6 - Perfil fenotípico dos leucócitos que migraram para a pleura após o desafio com Ang-(1-7)	47
5.7 - Os receptores CCR2 e Mas estão envolvidos na migração de células mononucleares <i>in vivo</i>	48
5.8 - A via MEK/ERK está envolvida na migração celular <i>in vivo</i> induzida pela Ang-(1-7).	49
5.9 - Efeito do tratamento com antagonista do receptor Mas (A779) na resolução da pleurisia induzida por LPS	50
5.10 - A pleurisia induzida por LPS é exacerbada em animais deficientes em Mas (Mas ^{-/-})	51
7. CONCLUSÃO	61
8. PERSPECTIVAS.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação constitui uma resposta imunológica classicamente desencadeada por infecção e/ou dano tecidual com o propósito fisiológico de promover proteção, adaptação e retorno à homeostase. Uma típica resposta inflamatória consiste de quatro componentes: um indutor inflamatório (lesão estéril ou uma infecção), sensores que detectam esse indutor, mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores e o tecido/órgão-alvo afetado pelos mediadores (Medzhitov, 2008; Medzhitov, 2010). **Figura 1.**

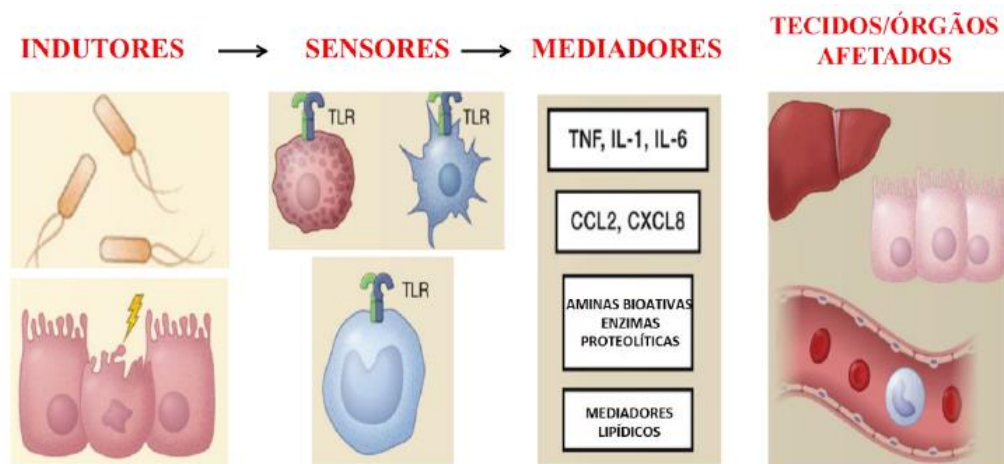


Figura 1: componentes da resposta inflamatória. A resposta inflamatória consiste de indutores, sensores, mediadores e tecidos-alvo. Indutores desencadeiam a resposta inflamatória e são detectados pelos sensores. Sensores, como os receptores do tipo *Toll* (TLRs), são expressos em células sentinelas especializadas, como os macrófagos residentes, células dendríticas e mastócitos. Eles induzem a produção de mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas bioativas como a bradicinina, produtos de cascata proteolítica e mediadores lipídicos. Esses mediadores atuam em vários tecidos para promover mudanças no seu estado funcional que otimiza a adaptação à condição (infecção ou lesão estéril) associada com o indutor que desencadeou a resposta inflamatória. Os componentes mostrados na figura representam uma pequena amostra da gama de indutores, sensores, mediadores e tecidos-alvo envolvidos na resposta inflamatória. Adaptado de Medzhitov, 2010.

Uma resposta inflamatória bem sucedida resulta na eliminação do agente indutor da inflamação, no reparo tecidual seguido de cicatrização, em alguns casos, e no estabelecimento de uma memória imunológica que garanta uma resposta mais rápida e específica em uma futura infecção pelo mesmo agente (Medzhitov, 2010; Fullerton & Gilroy, 2016). A inflamação já é reconhecida pela humanidade há

milhares de anos especialmente por possuir sinais e sintomas bastante notáveis e por ser um processo fisiológico que acompanha as feridas e infecções. Com base na descrição feita pelo médico romano Cornelius Celsus, no primeiro século a.C., são reconhecidos como sinais cardinais da inflamação: o rubor (vermelhidão devido à hiperemia), o tumor (inchaço causado por aumento da permeabilidade microvascular e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), o calor (associado com o aumento do fluxo sanguíneo e hipertermia), e a dor (em parte devido a alterações nas terminações nervosas). Um quinto sinal foi adicionado posteriormente por Rudolf Virchow em 1858, a perda da função, associada à disfunção dos órgãos envolvidos no processo inflamatório (Medzhitov, 2010).

Do ponto de vista microscópico, conceitos introduzidos no final do século 19 por Elie Metchnikoff contribuíram para o estabelecimento dos eventos celulares básicos da inflamação e apontou o papel essencial de leucócitos, tanto na defesa do hospedeiro quanto na manutenção da homeostase tecidual (Medzhitov, 2010).

Atualmente se reconhece que a inflamação é um processo complexo e altamente coordenado, constituído por múltiplos componentes, e que pode ser controlado nas suas diferentes fases. Resumidamente, a resposta inflamatória é iniciada pelo reconhecimento do agente indutor por meio de sensores presentes em células residentes do tecido, como os macrófagos, linfócitos, mastócitos e células dendríticas. Em seguida ocorre a produção de mediadores inflamatórios solúveis, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, radicais livres, mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (eicosanóides) e componentes do sistema do complemento. Como resultado, ocorrem a quimiotaxia e migração dos leucócitos para o sítio inflamatório, favorecidos pela regulação positiva de moléculas de adesão em ambos, leucócitos circulantes e células endoteliais (Medzhitov, 2010; Sousa et al., 2013a).

Os monócitos expressam uma variedade de receptores de quimiocinas. O receptor CCR2 é expresso em um subconjunto de monócitos que estão associados com a resposta imune contra infecção e a patogênese de desordens inflamatórias. A quimiocina CCL2 é o principal ligante de CCR2. Camundongos com deficiência desse receptor mostram susceptibilidade aumentada a infecções por alguns patógenos, incluindo a bactéria intracelular *Listeria monocytogenes*. Mas, de forma

contrária, são protegidos do desenvolvimento de aterosclerose e encefalite autoimune, duas doenças inflamatórias macrófago-mediadas (Serbina & Pamer, 2006). CCL2 estimula a quimiotaxia de monócitos e vários eventos celulares associados à quimiotaxia, incluindo fluxo de Ca^{2+} e expressão de integrinas. É também um indutor fraco da expressão de citocinas em monócitos e, em altas concentrações, desencadeia uma explosão respiratória levando à geração de espécies reativas de oxigênio (Palomino & Marti, 2015).

O processo de recrutamento de leucócitos para o tecido é complexo, mas pode ser didaticamente dividido em etapas. De maneira resumida, os leucócitos são atraídos do lúmen para a parede do vaso sanguíneo, são capturados e rolam pelo endotélio por meio de interações fracas mediadas por selectinas, com consequente ativação celular. Posteriormente ocorre uma adesão firme ao endotélio, permitindo a transmigração e a migração dos leucócitos para o tecido em direção ao estímulo quimiotático (Simon & Green, 2005; Petri et al., 2008; Yuan et al., 2012; Kratochvil et al., 2017) **Figura 2.** Ao atingir o sítio inflamatório, esses leucócitos funcionam primariamente como fagócitos para a eliminação de microrganismos e restos celulares por diferentes mecanismos. Dentre outros mecanismos efetores, pode-se citar a fagocitose, a netose, ou lançamento de armadilhas neutrofílicas compostas majoritariamente por material genético e proteases, a liberação de proteases e a geração de espécies reativas de oxigênio (Hickey & Kubes, 2009).

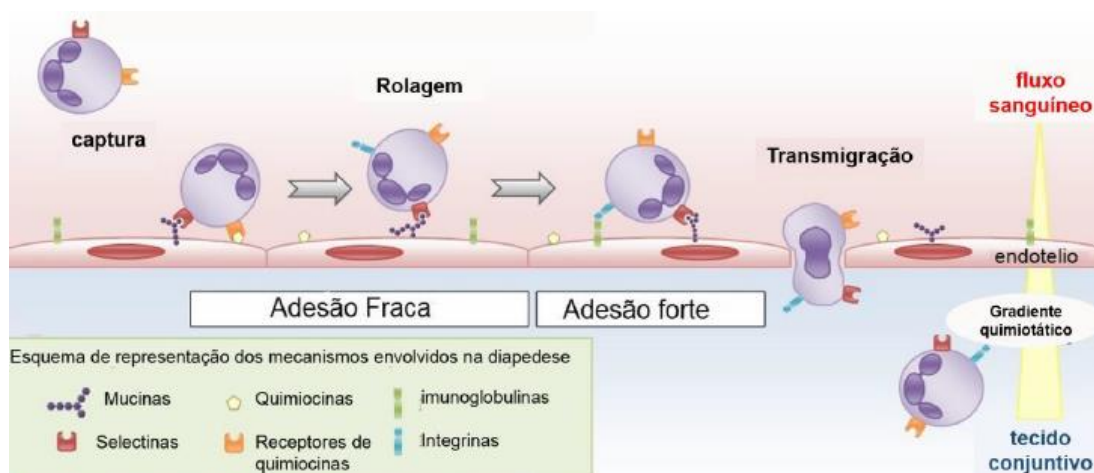


Figura 2: Resumo das interações que ocorrem entre leucócitos e células endoteliais durante a inflamação. Diante de estímulos inflamatórios, moléculas de adesão são mais expressas em neutrófilos e células endoteliais. Os neutrófilos rolam ao longo da parede endotelial vascular realizando interações fracas mediadas pelas selectinas. A partir daí, ocorre uma adesão firme dos neutrófilos com o endotélio, por meio de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM) na superfície da célula endotelial e integrinas (Mac-1 e VLA) na superfície do neutrófilo. Por fim, os neutrófilos

transmigram através do endotélio por meio de um processo que envolve interações complexas com moléculas junctionais do endotélio, VE-caderina, JAMs e PECAM-1. Adaptado de Yuan et al., 2012.

Os neutrófilos representam o maior grupo de leucócitos encontrados na circulação sanguínea humana e são as primeiras células recrutadas para o sítio inflamatório (Petri et al., 2008). Esses leucócitos polimorfonucleares (PMN) são produzidos na medula óssea a partir de um progenitor mielóide e, na circulação, possuem uma meia vida de 6 a 8 horas (Tak et al., 2013). Após migrar para o tecido, a meia-vida dos neutrófilos pode ser prolongada de 3 a 5 dias, principalmente pela ação de mediadores inflamatórios produzidos localmente, o que garante tempo suficiente para exercer suas ações antibacterianas e fagocitárias (Summers et al., 2010).

Em seguida à primeira onda de migração de neutrófilos, ocorre migração de monócitos os quais se diferenciam em macrófagos ao atingirem o tecido. Os macrófagos são considerados fagócitos profissionais, ou seja, células cuja função primária é a de fagocitar partículas inertes ou microrganismos. Os macrófagos também estão envolvidos na remoção de células apoptóticas que são geradas durante a remodelação tecidual e resolução dos processos inflamatórios. Além de amplificarem a resposta efetora dos neutrófilos, por meio da produção de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas e também dos processos de *clearance*, os macrófagos desempenham um papel importante na resposta imune adaptativa, como apresentadores de antígenos aos linfócitos (Nathan, 2008; Poon et al., 2014). É importante ressaltar que os macrófagos são células altamente plásticas que adotam fenótipos distintos dependendo do estímulo a que estejam submetidos (Mosser & Edwards, 2008).

Tanto os neutrófilos quanto os macrófagos agem no reconhecimento de MAMPs (padrões moleculares associados a microrganismos, do inglês: *microbe associated molecular patterns*) e DAMPs (padrões moleculares associados ao dano celular, do inglês: *damage associated molecular patterns*), por meio de receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês: *toll-like receptors*), ou outros receptores da resposta imune inata. Um dos receptores mais estudados é o TLR4, que medeia respostas às bactérias Gram negativas por meio do reconhecimento do lipopolissacarídeo de membrana, o LPS. Este reconhecimento desencadeia a ativação de cascatas de

sinalização intracelulares e de genes pró-inflamatórios, a produção de mediadores, recrutamento leucocitário e estabelecimento do processo inflamatório (Prince *et al.*, 2011).

1.2 O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA) é classicamente conceituado como um sistema humoral que controla diversas funções cardiovasculares, renais e adrenais; além do equilíbrio de líquidos e eletrólitos. A cascata do chamado SRA clássico inicia-se com a biossíntese da enzima renina pelas células justaglomerulares renais a partir da pré-pró-renina (Griendling *et al.*, 1993). Após clivagens sequenciais, a renina ativa é secretada na circulação sanguínea (Naruse *et al.*, 1982), clivando o angiotensinogênio proveniente do fígado e formando o decapeptídeo inativo Angiotensina I (Ang I). Este é hidrolisado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), culminando na formação de Angiotensina II (Ang II) (Carey & Siragy, 2003; Lovren *et al.*, 2008), cujos efeitos vasculares, cardíacos, renais e adrenais são mediados por dois receptores acoplados à proteína G (Nguyen Dinh Cat & Touyz, 2011) **Figura 3**.

O receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1) está expresso nas células musculares lisas da vasculatura, no coração e também em outros órgãos, como o rim e o cérebro (Michael Bader & Ganten, 2008). A interação da Ang II com esse receptor é responsável por vasoconstrição, progressão de processos inflamatórios e proliferativos, entre outros efeitos (Ferrario, 2006). Por sua vez, o receptor de angiotensina do tipo 2 (AT2), que se encontra bastante expresso durante o período embrionário, tem expressão reduzida após o nascimento (Carey & Siragy, 2003). Ele medeia muitos efeitos contrários àqueles do receptor AT1 (Carey, 2005). Dessa forma, os efeitos fisiológicos principais do SRA clássico recaem sobre o receptor AT1 (Ferrario, 2006).

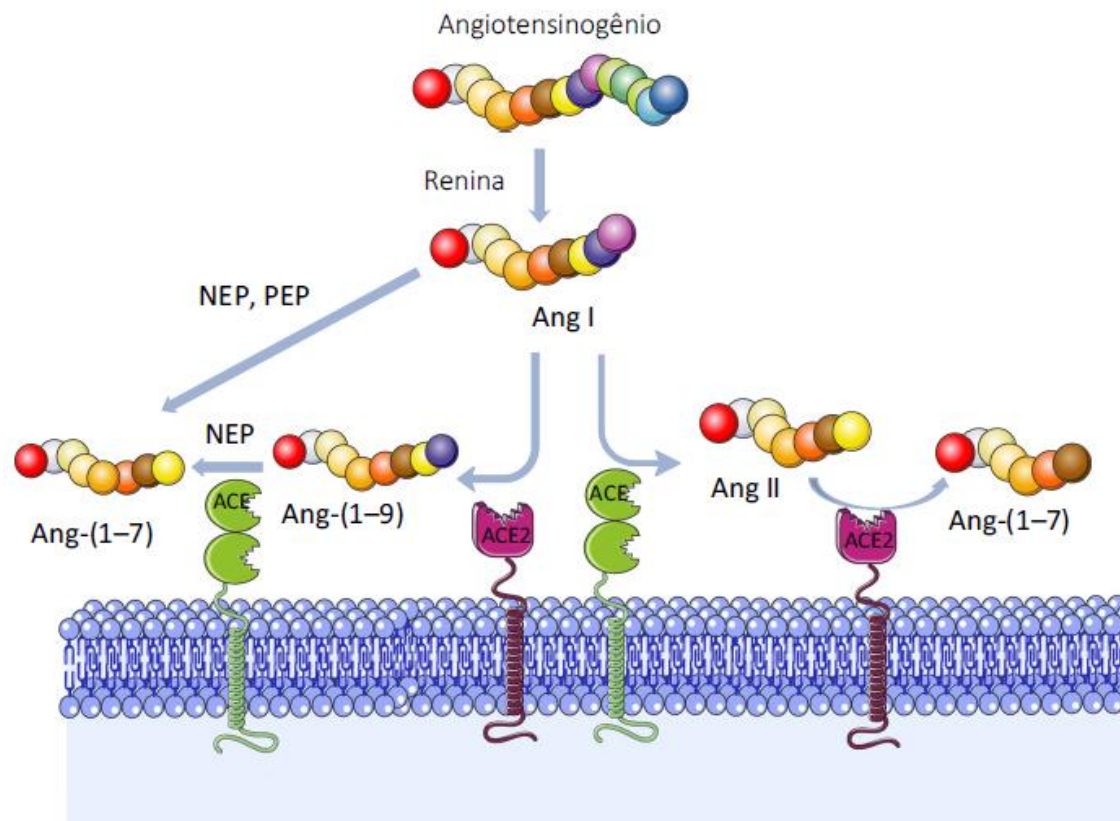


Figura 3: Esquema simplificado do sistema renina angiotensina (RAS). ACE, enzima conversora de angiotensina; ACE2, enzima conversora de angiotensina 2; Amp, aminopeptidase; Ang I, angiotensina I; Ang II, angiotensina II; Ang-(1-7), angiotensina 1-7; Ang-(1-9), angiotensina 1-9; NEP, endopeptidase neutra; PEP, Prolil endopeptidase. Adaptado de Silva D. *et al.*, 2016.

A identificação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que antagoniza algumas das ações do eixo Ang II/ECA/AT1 ao promover a degradação de Ang II para o nonapeptídeo angiotensina-(1-9) e o heptapeptídeo angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (Lovren *et al.*, 2008; Nguyen Dinh Cat & Touyz, 2011), permitiu a visualização de um novo eixo no SRA (Lautner *et al.*, 2013; Sampaio *et al.*, 2017). A Ang-(1-7) também pode ser sintetizada por outras vias a partir de Ang I ou da própria angiotensina-(1-9) pela ação de endopeptidases e, uma vez formada, pode ser degradada pela ECA e por aminopeptidases em fragmentos inativos (Yamamoto, Chappell, Brosnihan, & Ferrario, 1992). Esse peptídeo está presente tanto na circulação como nos tecidos, como cérebro, coração, vasos sanguíneos e outros (Sampaio *et al.*, 2007). De forma contrária à Ang II, a Ang-(1-7) é um potente vasodilatador (Ferrario *et al.*, 1997), possuindo também efeitos antiproliferativos e anti-inflamatórios (Souza & Costa-Neto, 2012). Esses efeitos são mediados pelo receptor Mas acoplado à proteína G, do qual esse heptapeptídeo é um agonista

endógeno (Santos et al., 2003), e, juntamente com a ECA2, compõem parte do chamado eixo alternativo do SRA. Em camundongos, esse receptor está expresso em vários tecidos como o cérebro, testículo, coração e pulmão (Bader *et al.*, 2014). A utilização de bloqueadores farmacológicos, como o (D-Ala7)-Angiotensina I/II (1-7) (A779) em estudos do papel do receptor Mas *in vivo* e *in vitro*, têm sido de grande valia para a compreensão das vias intracelulares ativadas pela interação Ang-(1-7)-receptor Mas, que levam aos efeitos anteriormente citados em diversos modelos experimentais (Da Silveira *et al.*, 2010; Souza; Costa-Neto, 2012; Villalobos *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017).

1.2.1 Angiotensina-(1-7)

A Ang-(1-7) parece atuar como um peptídeo contra-regulador da Ang II por meio da oposição aos seus efeitos, especialmente, vasoconstrição e proliferação celular. Ang-(1-7) possui atividade biológica em vários órgãos. No coração, a Ang-(1-7) parece exercer um papel cardioprotetor, podendo prevenir o remodelamento cardíaco, via redução da hipertrofia e fibrose. Esse peptídeo tem atividade vasodilatadora dependente do endotélio. Pode estimular a produção de óxido nítrico (NO) (Ferrario *et al.*, 1997; Sampaio *et al.*, 2007) por meio de uma via dependente de AKT, prostaglandinas ou fator relaxante derivado do endotélio, além de potencializar a ação da bradicinina. Possui, também, efeito antiproliferativo em células de músculo liso vascular e tecido fibrovascular, é antitrombótico e antiarritmogênico e inibe a expressão da ECA (Ferrario *et al.*, 1997; Sampaio *et al.*, 2007). Além disso, pode atuar como um importante neuromodulador, especialmente em áreas relacionadas com o controle tônico e reflexo da pressão arterial (Santos *et al.*, 2000). Sintetizada na circulação ou em diferentes tecidos principalmente pela enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), a Ang-(1-7) exerce suas ações em grande parte por meio da ativação do receptor Mas, o qual é acoplado à proteína G.

Mais recentemente, estudos demonstraram que a Ang-(1-7) modula negativamente a migração de leucócitos, a expressão e liberação de citocinas e ativação de vias fibrogênicas, influenciando desta forma, nas respostas inflamatórias. Foi demonstrado que o tratamento com Ang-(1-7) é capaz de reduzir o recrutamento de

neutrófilos e diminuir o dano tecidual em um modelo de artrite induzida por antígeno (Da Silveira *et al.*, 2010). Em outro 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 conseqüente diminuição do dano tecidual (Barroso *et al.*, 2012). Mais recentemente, foram demonstrados alguns efeitos pró-resolutivos da Ang-(1-7), como a indução da apoptose de polimorfonucleares e do processo de eferocitose (Barroso *et al.*, 2017; Magalhaes *et al.*, 2018) e a reprogramação de macrófagos *in vitro* (Hammer *et al.*, 2016) e *in vivo* (Santuchi *et al.*, 2019). A **Tabela 1** sintetiza alguns estudos que avaliam a relevância de Ang-(1-7) e do receptor Mas no contexto de inflamação. No entanto, ainda não é conhecido se a Ang-(1-7) é capaz de induzir recrutamento de células importantes para a resolução, como os monócitos/macrófagos.

Orgão/Modelo	Compostos ou estratégias utilizadas	Efeitos	Referências
Fibrose hepática	A779	Aumento dos níveis de prolina e TGF- β	Pereira, R.M. <i>et al.</i> , 2006
Artrite	Ang-(1-7) e AVE0991	Redução do acúmulo de neutrófilos, dos níveis de TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β e de parâmetros histológicos.	Silveira, K.D. <i>et al.</i> , 2010.
Asma	Ang-(1-7) e A779	Diminuição do recrutamento de PMNs e de fibrose. Uso de A779: prevenção do efeito do tratamento com Ang-(1-7).	El-Hashim, A.Z. <i>et al.</i> , 2012
Isquemia e referfusão renal	AVE0991	Redução dos níveis de CXCL-1, MPO e dano tecidual	Barroso L.C. <i>et al.</i> , 2012
Aterosclerose	AVE0991	Redução de CD86, CD80 e CD40 em macrófagos e células dendríticas. Redução da expressão de CD69 em células T CD4+	Jawien, J., <i>et al.</i> , 2012
Modelo de hiperalgesia	Ang-(1-7)	Redução da hipernocicepção	Costa, A.C.O. <i>et al.</i> , 2012.
Esteatose hepática induzida por dieta rica em gordura	Ang-(1-7)	Redução dos níveis de IL-6 e TNF- α .	Feltenberger, J.D. <i>et al.</i> , 2013
Modelo de injúria pulmonar	Ang-(1-7)	Redução do edema	Klein, N. <i>et al.</i> , 2013

aguda		pulmonar, MPO, score histológico e resistência vascular pulmonar	
Asma	AVE0991	Redução dos níveis de IL-5, aumento de IL-10	Rodrigues-Machado, M.G. et al., 2013
Aneurisma intracranial	Ang-(1-7)	Redução de MMP-9 e TNF- α , aumento de HGF e COX-2	Pena Silva, R.A. et al., 2014
Carcinoma	Ang-(1-7)	Redução do tamanho do tumor e níveis de IGF-I e VEGF	Abd-alhaseeb, M.M. et al., 2014
Fibrose pulmonar	Ang-(1-7)	Redução da fibrose pulmonar, níveis de CTGF e colágeno I, TNF- α e IL-6	Meng, Y. et al., 2014
Diabetes tipo II	Ang-(1-7)	Redução da fibrose renal, ROS, infiltração de MO	Mori, J. et al., 2015
Inflamação pulmonar alérgica crônica	Ang-(1-7)	Redução dos níveis de IgE, IL-4, IL-5, GM-CSF, CCL5 e CCL2, deposição de colágeno.	Magalhães, G.S. et al., 2015
Síndrome da Insuficiência Respiratória Aguda	Ang-(1-7)	Redução do recrutamento de leucócitos e deposição de colágeno	Zambelli, V. et al., 2015
Inflamação pulmonar alérgica crônica	Animais Mas ^{-/-}	Aumento de células totais, de eosinófilos e mononucleares, aumento de IL-13, TNF- α , CCL2 e CCL5, aumento de deposição de matriz extracelular	Magalhães, G.S. et al., 2016
Diabetes tipo II	Ang-(1-7)	Redução de fibrose, IL-1 β e do estresse oxidativo	Papinska, A.M. et al., 2016
Aterosclerose	AVE0991	Redução do recrutamento de MO inflamatórios, células NK e linfócitos T, redução de CCL-2, CCL-5, CXCL-10, TNF- α e IL-6	Skiba, D.S. et al., 2017
Injúria renal	Ang-(1-7)	Redução do estresse oxidativo, fibrose, IL-6 e TNF- α , diminuição de proteínas de matriz extracelular e dos níveis de CTGF e TGF- β	W Lu. Et al., 2017
Artrite	Ang-(1-7) e A779	Aumento da apoptose de neutrófilos e eferocitose, diminuição da ativação de NF κ B. Uso de A779: aboliu os efeitos de Ang-(1-7).	Barroso L.C. et al., 2017
Asma	Ang-(1-7)	Redução no número de eosinófilos, atividade de	Magalhães, G.S. et al., 2018

		EPO, aumento da apoptose de eosinófilos e eferocitose de PMNs, redução da deposição de matriz extracelular, dos níveis de NFκB, Erk1/2, IκB-α e GATA3	
--	--	---	--

Tabela 1: Estudos que avaliam a relevância de Ang-(1-7) e do receptor Mas no contexto de inflamação. A779 – antagonista do receptor Mas; Ang I – angiotensina I; Ang II – angiotensina II; Ang (1-7) – Angiotensina 1-7; ACE – enzima conversora de angiotensina; ACE2 – enzima conversora de angiotensina II; AVE0991- agonista sintético do receptor Mas, Mas – receptor Mas, MMP9 – matriz metalopeptidase, EPO – peroxidase eosinófila, TGF-β – Fator de Crescimento Tumoral beta, TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa, IL – Interleucina, CXCL – Chemokine, MMP-9 - Metaloproteinase 9, HGF – Fator de Crescimento de Hepatócito, COX-2 – Ciclooxigenase 2, IGF-1 – Fator de Crescimento derivado da Insulina 1, VEGF – Fator de Crescimento derivado do Endotélio Vascular, CTGF – Fator de crescimento do tecido conjuntivo, GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos, INF-γ - Interferon gama, VCAM –Molécula de Adesão de Célula Vascular, ICAM1 – Molécula de Adesão Intercelular 1, NFκB - fator nuclear kapa B.

1.3 Resolução da Inflamação

Apesar do propósito fisiológico protetor da inflamação, uma resposta inflamatória exacerbada ou que não se resolve pode causar lesão tecidual e resultar em uma série de desordens crônicas (Nathan & Ding, 2010). Por esse motivo, é necessário que um programa resolutivo ativo e coordenado se inicie após o início da resposta inflamatória a fim de criar um ambiente favorável para que a inflamação termine adequadamente (Sugimoto *et al.*, 2016). A manutenção do agente indutor, a ativação excessiva e patológica de vias pró-inflamatórias ou mesmo uma falha nos mecanismos resolutivos podem resultar em uma resolução ineficiente ou inadequada da inflamação (Nathan & Ding, 2010).

A resolução da inflamação é um processo ativo e contínuo que envolve a produção e ativação de diferentes mediadores bioquímicos e vias de sinalização para assegurar uma restauração rápida e bem sucedida dos tecidos. Vários são os passos que conduzem a resolução eficiente do processo inflamatório, como: cessamento do recrutamento de neutrófilos, tamponação/inativação dos mediadores pró-inflamatórios, indução da apoptose de neutrófilos seguido de *clearance* pelos macrófagos, recrutamento não flogístico de monócitos que se diferenciam localmente em macrófagos contribuindo assim para uma maior eficiência de *clearance*, mudanças do fenótipo dos macrófagos para perfis resolutivos com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos (Sousa *et al.*, 2013) (Sugimoto *et al.*, 2016). Esses eventos estão representados na **Figura 4**.

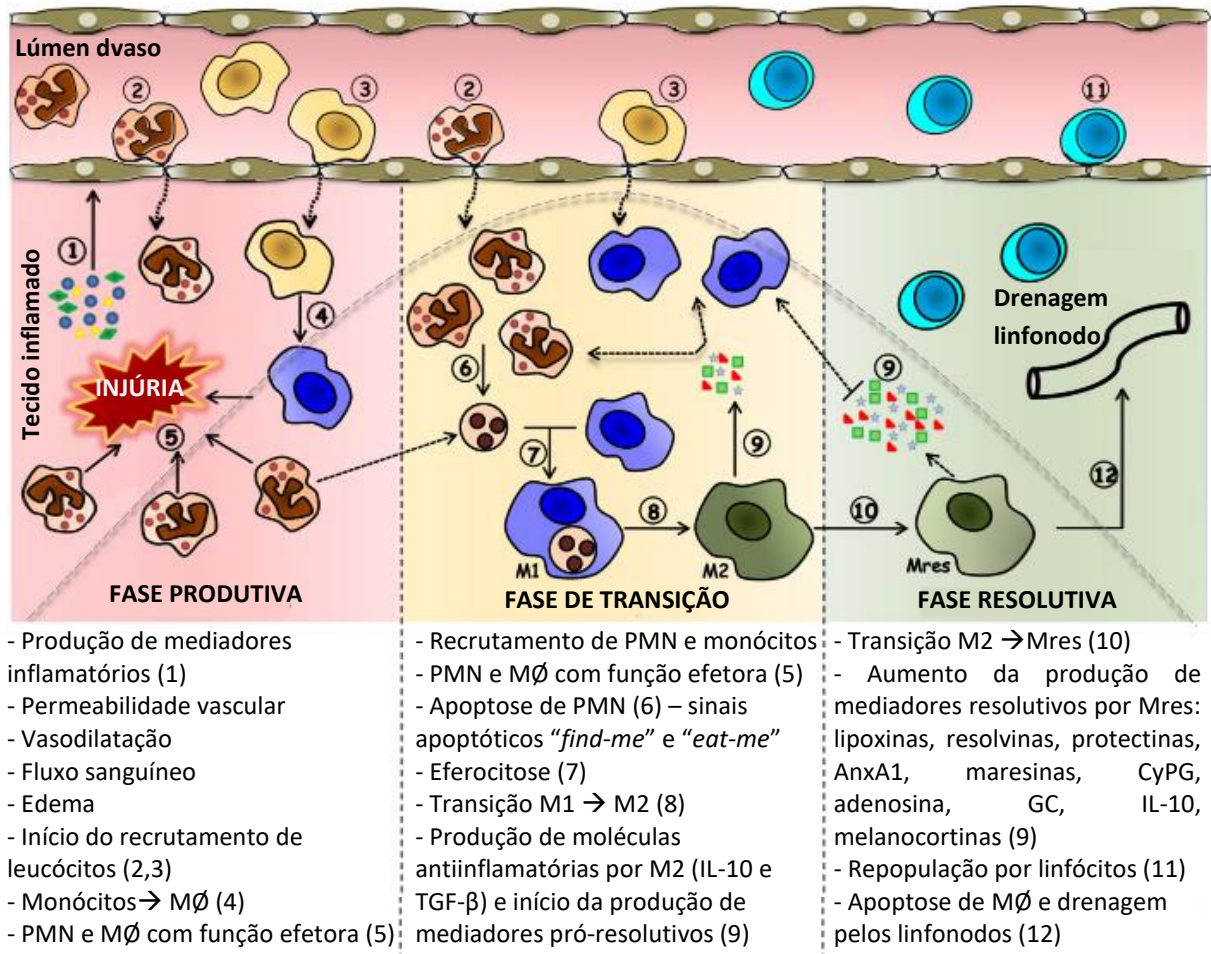


Figura 4: Série orquestrada de eventos que levam a resolução do processo inflamatório agudo.

A lesão tecidual estéril ou infecciosa leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou MAMPs) pelas células residentes, as quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios. Na fase produtiva da inflamação, esses mediadores levam à ativação endotelial e recrutamento de leucócitos para o local inflamado. Leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são geralmente as primeiras células a serem recrutadas, seguidas de monócitos. Essas células exercem, portanto, suas funções efetoras contra o agente responsável pela lesão. Em uma fase de transição, ocorre intensa apoptose de PMNs, seguida por eferocitose por macrófagos, que alteram, consequentemente, seu perfil inflamatório (M1) para anti-inflamatório (M2). Esses macrófagos liberam mediadores anti-inflamatórios e resolutivos, essenciais para o início do processo de resolução. Nesse processo, macrófagos do tipo M2 têm seu perfil alterado para macrófagos do tipo resolutivo (Mres), que produzem moléculas antioxidantes e antifibróticas, conduzindo finalmente ao retorno da homeostase tecidual com o mínimo de lesão. Adaptado de Alessandri *et al.*, 2013.

Nenhuma dessas etapas ocorre espontaneamente, mas são ativamente induzidas pelos mediadores resolutivos. Tais mediadores são de natureza diversa e incluem lipídeos (lipoxinas, resolvinas, maresinas), proteínas (Anexina A1, galectinas), gases (H₂S e CO), purinas (adenosina), bem como neuromoduladores

liberados sob o controle do nervo vago (acetilcolina e outros neuropeptídeos) (Revisto por: Sugimoto *et al.*, 2016).

Apesar de já existir um número considerável de mediadores resolutivos descritos na literatura, novas moléculas endógenas promotoras da resolução tendem a ser descobertas à medida que se amplia o entendimento sobre a resolução da inflamação, seus mecanismos e os diferentes sistemas biológicos com os quais interagem afim de contribuírem para homeostase.

1.3.1 O papel dos macrófagos na progressão e resolução da resposta inflamatória

Macrófagos são células da imunidade inata com papel bem estabelecido na resposta primária a patógenos e lesão tecidual, e com importantes funções na homeostasia tecidual, coordenação da resposta imune adaptativa, inflamação, resolução e reparo tecidual. (Martinez *et al.*, 2009). Os macrófagos residentes do tecido podem ser originados do saco vitelino ou a partir de monócitos circulantes (Stremmel *et al.*, 2018). No segundo caso, os monócitos extravasam para o tecido onde são diferenciados para exercer suas funções.

Os macrófagos participam do início da inflamação e também do processo resolutivo (Sugimoto *et al.*, 2016). Os primeiros macrófagos a chegarem ao local da lesão apresentam um perfil pró-inflamatório e são chamados M1. Estes macrófagos apresentam alta capacidade fagocítica e baixa capacidade eferocítica e estão envolvidos com a liberação de mediadores inflamatórios como: citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Após eferocitose de células apoptóticas, os macrófagos mudam seu fenótipo para M2, aumentam a sua capacidade eferocítica e produzem moléculas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β . Produzem também mediadores pró-resolutivos que impedem o recrutamento adicional de neutrófilos e promovem o recrutamento de mais monócitos, amplificando a eficiência do processo de fagocitose (Mc Arthur *et al.*, 2015, Sugimoto *et al.*, 2016). Estes macrófagos estão envolvidos com o reparo tecidual e tem um papel importante no retorno da homeostase tecidual. No entanto, também podem promover a formação de cicatrizes e fibrose. Uma vez

desempenhado seu papel de remoção de células apoptóticas, os macrófagos M2 mudam novamente seu fenótipo para Mres (macrófago resolutivo). O Mres é dito como um macrófago saciado, apresentando baixa capacidade eferocítica. Também está envolvido com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, pró-resolutivos e anti-fibróticos, participando ativamente da resolução inflamatória, sendo posteriormente drenado pelos vasos linfáticos (Ariel & Serhan, 2012).

A migração não flogística de monócitos representa um passo importante para a resolução da inflamação (Sugimoto *et al.*, 2016). Durante a resolução, os macrófagos desempenham um papel anti-inflamatório/pró-resolutivo e são necessários para o *clearance* de células apoptóticas (Hochreiter-Hufford & Ravichandran, 2013). A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos (eferocitose), é um processo crítico para o programa de resolução. Um defeito na limpeza de células apoptóticas pode levar a necrose secundária dessas células, com liberação de conteúdo extracelular para o microambiente tecidual e posterior ativação de eventos inflamatórios prejudiciais ao tecido. Esse defeito está associado a muitas doenças inflamatórias autoimunes e crônicas (Nathan & Ding, 2010; Poon *et al.*, 2014). Além disso, ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o processo de eferocitose promove a reprogramação de macrófagos de um fenótipo pró-inflamatório para um fenótipo pró-resolutivo, o que modula a resposta inflamatória (Ariel & Serhan, 2012; Sousa *et al.*, 2013a). Esse processo também conhecido como “silenciamento imunológico” causa redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, e indução das citocinas pró-resolutivas e promotoras de reparo tecidual TGF- β e IL-10 (Fadok *et al.*, 1998; Byrne & Reen, 2002; Huynh *et al.*, 2002). Além disso, a eferocitose induz alterações típicas de M2 nos macrófagos, como a indução de Arginase-1 e inibição da expressão da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*), com consequente redução de óxido nítrico reativo (Freire-de-Lima *et al.*, 2006; Ariel & Serhan, 2012).

A maquinaria intracelular responsável pela motilidade celular é finamente regulada para produzir eventos morfológicos críticos, como a polarização celular e alterações morfológicas desencadeadas por mudanças no citoesqueleto, que resultam em translocação da célula. A via das MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) desempenha um papel importante na proliferação e sobrevivência celular e está envolvida em eventos de quimiotaxia. A ativação da MAPK ERK1/2

(cinase regulada por sinais extracelulares) está implicada na polimerização de F-actina e no turnover de aderências focais, necessários para a morfogênese e migração celular (Chen *et al.*, 2003). Portanto, é importante a compreensão de seu papel específico ou cooperação durante o processo de quimiotaxia.

As MAPKs ERK1/2 e as proteínas p38 e JNK pertencem a uma família de proteínas sinalizadoras envolvidas na diferenciação celular, resposta ao estresse, apoptose e inflamação (Junttila *et al.*, 2007; Arthur & Ley, 2013).

No processo de sinalização celular, a cascata de sinalização inicia com a interação entre os ligantes/agonistas e receptores específicos. Esses são ativados por fosforilação, promovendo a ativação de cinases citosólicas, como a ERK1/2. A P-ERK1/2 fosforila diversas proteínas alvo, incluindo enzimas, proteínas estruturais, reguladores de apoptose e fatores de transcrição. A ERK é ativada por duas diferentes MAPK 3-cinases (MAPKKK), membros da família Raf (Raf-1, B-Raf, e A-Raf) ou locus de progressão tumoral-2 (TPL-2), também conhecido como COT e MAP3K8. A Raf e a TPL-2 podem fosforilar e ativar as MAPK 2-cinases (MAPKK), MEK1 e MEK2, cujos únicos substratos conhecidos são a ERK1 e ERK2. A ativação de ERK, subsequente à ligação do receptor de fator de crescimento de tirosina-cinase, e dos receptores de quimiocinas é mediada pela Raf. A ligação de um agonista promove o carregamento de guanosina trifosfato (GTP) para GTPasesRas que, em seguida, recrutam a MAP 3-cinase Raf para a membrana plasmática, onde é ativada por fosforilação, com subsequente ativação de MEK1/2 e ERK1/2. Em seguida, estas proteínas transdutoras de sinais podem fosforilar fatores de transcrição que se translocam para o núcleo, se ligam às sequências de DNA específicas nos promotores dos genes e promovem a transcrição de genes alvo pela RNA polimerase II. O fator de transcrição NF- κ B é um dos fatores transcricionais ativados por ERK1/2 e está relacionado a respostas celulares resultantes de estímulos como estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, LDL oxidada, e antígenos bacterianos ou virais. Ao alterar os níveis e atividades de fatores de transcrição, as MAPKs regulam a transcrição de genes importantes para o ciclo celular (Junttila *et al.*, 2007; Arthur & Ley, 2013). Um dos genes alvo da via ERK1/2 \rightarrow NF- κ B é o que codifica para a quimiocina CCL2, um importante quimiotático para células mononucleares (Carmo *et al.*, 2014) **Figura 5.**

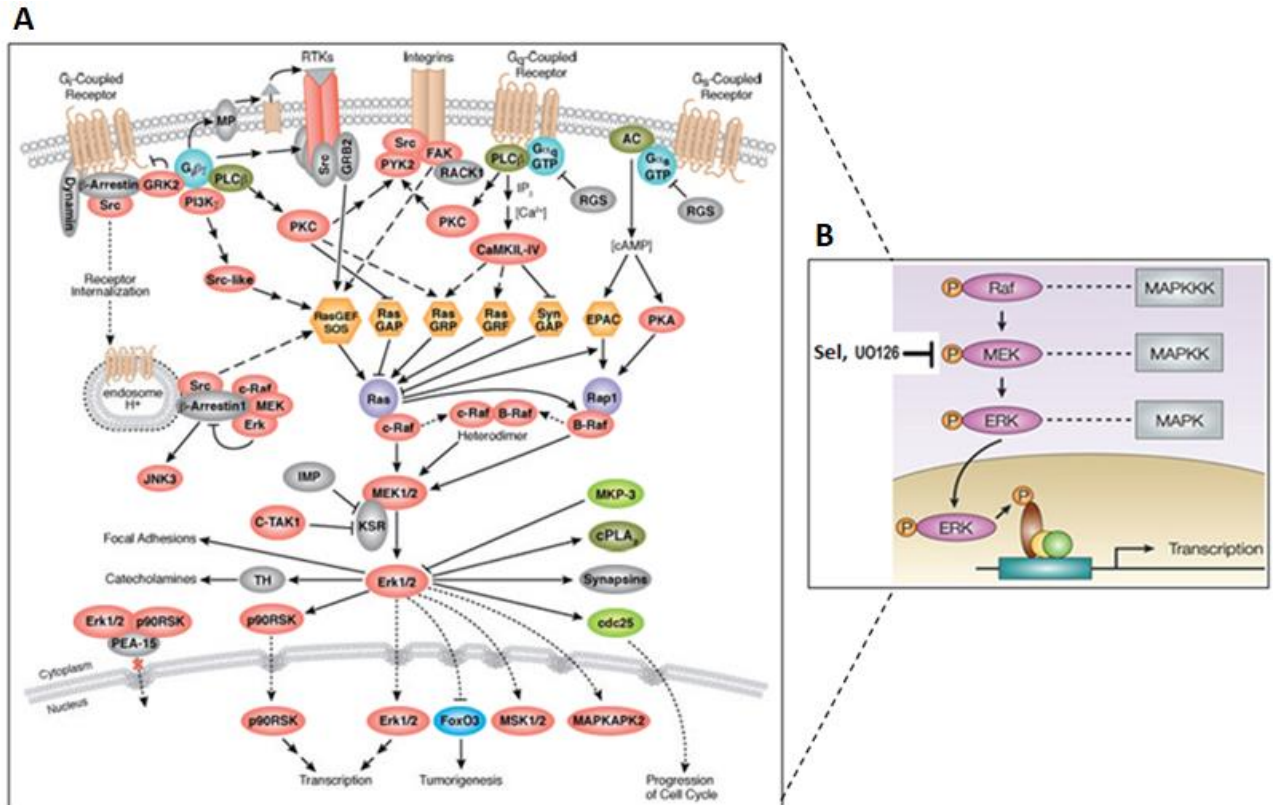


Figura 5: Vias de sinalização celular desencadeadas para ativação da MAPK/ERK e seus alvos. (A). Na figura (B) está sinalizado o local onde o inibidores Selumetinibe e U0126 atuam para inibir a via MEK/ERK. (A) Adaptado de Site *Cell Signaling Technology* (<http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>). (B) Kim *et al.* 2004.

Sabendo-se da importância dos macrófagos para a resolução da inflamação, buscamos neste estudo avaliar o efeito da Ang-(1-7) no recrutamento deste tipo celular, o que poderia contribuir sobremaneira para o entendimento do mecanismo de atuação da Ang-(1-7) no processo de resolução.

2. JUSTIFICATIVA

Permitir um recrutamento eficiente de células com o mínimo de dano ao tecido acometido é um dos grandes desafios no controle do processo inflamatório, visto que os mediadores provenientes dos leucócitos podem levar à lesão tecidual e disfunção do órgão. Assim, existe um grande interesse em elucidar os mecanismos responsáveis pelo recrutamento e eliminação dessas células do sítio inflamatório.

Pesquisas recentes demonstram que a Ang-(1-7) pode atuar como um mediador pró-resolutivo importante no contexto das inflamações agudas, atuando na diminuição da produção de mediadores e recrutamento de células inflamatórias (Da Silveira *et al.*, 2013) induzindo apoptose de neutrófilos humanos e estimulando a eferocitose (Lívia C. Barroso *et al.*, 2017). Trabalhos recentes mostram que o eixo Ang-(1-7)/MasR também atua na reprogramação de macrófagos (Hammer *et al.*, 2016; Santuchi *et al.*, 2019). No entanto, ainda não é conhecido se Ang-(1-7) é capaz de induzir recrutamento de células importantes para a resolução, como os monócitos/macrófagos, o papel das quimiocinas e os mecanismos subjacentes a este processo

Neste projeto, nos propusemos a estudar o papel da Ang-(1-7) na indução da migração celular, uma vez que o recrutamento não flogístico de monócitos é um evento importante para resolução da inflamação. Embora Ang-(1-7) ou o agonista sintético do receptor Mas, Ave 099, tenham sido estudados em diferentes contextos experimentais de inflamação e atuam, de forma geral, inibindo o recrutamento de leucócitos, propomos aqui estudar o papel da Ang-(1-7) na migração de monócitos/macrófagos, na ausência de estímulo inflamatório ou durante a fase resolutiva da inflamação. Para tal, procuramos elucidar os receptores, as vias de sinalização (focando na via das MAPKs) e as quimiocinas envolvidas na indução da migração de leucócitos para a pleura de camundongos. Assim, diante do complexo mecanismo que rege o recrutamento e a manutenção de células nos sítios inflamatórios, o estudo dos diversos fatores envolvidos no acúmulo leucocitário no sítio inflamatório é de importância fundamental para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que possam interferir nessas vias controlando a inflamação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o papel da Ang-(1-7) na migração de células inflamatórias, avaliando a capacidade deste peptídeo de induzir migração celular de monócitos/macrófagos *in vitro* e *in vivo* e os mecanismos subjacentes a esse processo.

3.2 Objetivos específicos

1- Avaliar a habilidade da Ang-(1-7) em induzir quimiotaxia *in vitro* em culturas de macrófagos murinos (RAW 264.7) e em monócitos e neutrófilos humanos.

2- Avaliar o efeito do A779 (antagonista do receptor Mas) e do RS504393 (antagonista de CCR2) na quimiotaxia de macrófagos murinos (RAW 264.7) induzida por Ang-(1-7).

3- Investigar o envolvimento da via MEK/ERK na migração celular de macrófagos (RAW 264.7), induzida pela Ang-(1-7), por meio do uso dos inibidores seletivos da via, Selumetinibe e U0126.

4- Avaliar a habilidade e a cinética de migração/recrutamento de leucócitos, após a injeção de Ang-(1-7) nas cavidades articular e pleural de camundongos BALB/c.

5- Avaliar, por citometria de fluxo, o perfil fenotípico dos leucócitos recrutados para a pleura de camundongos BALB/c após injeção de Ang-(1-7)

6- Avaliar a participação do eixo CCL2/CCR2 na migração de leucócitos para a cavidade pleural de animais injetados com Ang-(1-7), por meio da mensuração dos níveis da quimiocina MCP-1/CCL2 e do uso do inibidor de CCR2 (RS504393).

7- Estudar o papel da via MEK/ERK1/2 *in vivo*, por meio da análise da fosforilação de ERK 1/2 e do uso do inibidor específico desta via, na migração de leucócitos induzida por Ang-(1-7).

8- Analisar o efeito do receptor Mas na pleurisia induzida por LPS utilizando-se duas estratégias: antagonismo seletivo do receptor Mas com a droga A779 e animais deficientes geneticamente para este receptor (MasR^{-/-}).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células e ensaios *in vitro*

4.1.1. Cultivo celular

Células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM (*Cultilab*), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SBF) e antibióticos (100U/mL de penicilina G e 100µg/mL de gentamicina) e os BMDMs em meio RPMI 1640 (*Cultilab*) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SBF), 30% de LCCM e antibióticos (100 U/mL de penicilina G e 100 µg/mL de gentamicina). As culturas celulares foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂, em estufa incubadora (*ThermoScientific*). A viabilidade celular foi determinada usando o ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

4.1.2. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humano

As amostras do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis foram recolhidas e diluídas em tampão fosfato (PBS) (1:2) pH 7,4 e aplicadas cuidadosamente sobre o Ficoll-Paque™ PLUS, d=1,078 g/mL (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden*). Logo após, foram centrifugadas a 1200 RPM por 40 minutos a temperatura ambiente para separação da camada de células mononucleares. As células presentes na interfase do gradiente de separação foram cuidadosamente coletadas, transferidas para um novo tubo e lavadas duas vezes em PBS para obtenção do precipitado celular. Posteriormente os monócitos foram separados dos linfócitos por seleção negativa imunomagnética utilizando o Kit EasySep (*StemCell Technologies*).

4.1.3. Isolamento de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

Foram retirados os fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 machos (tipo selvagem) e deficientes para o receptor CCR2, que é o receptor canônico para a

quimiocina CCL2. Posteriormente, os ossos ficaram imersos em RPMI em tubo tipo *Falcon*, sendo as epífises cortadas e os ossos lavados com RPMI não suplementado utilizando seringa de 5mL. As células obtidas do lavado foram colocadas em tubo *Falcon* já contendo meio RPMI, e posteriormente centrifugadas a 1300 RPM, 5 minutos e a temperatura ambiente. O sedimento obtido foi ressuspensão em meio RPMI suplementado com 20% de SFB e 30% de LCCM (sobrenadante de células L929), dissociando levemente os grumos com a pipeta sorológica. A suspensão celular foi colocada em placa de Petri juntamente com 9 mL de meio RPMI completo. No terceiro dia de diferenciação adicionou-se 10 mL do mesmo meio às placas. No sétimo dia os sobrenadantes das placas foram descartados e adicionados 10 mL de PBS/EDTA gelado às placas, que foram colocadas por 10 minutos na geladeira para auxiliar no despreendimento das células. Posteriormente, foram destacadas com o auxílio de uma pipeta. O conteúdo de cada placa foi centrifugado em tubo *Falcon* de 50 mL, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas e plaqueadas na concentração de 1×10^6 células por poço (placa de 24 poços).

4.1.4 Isolamento de neutrófilos do sangue periférico humano

Uma amostra de sangue venoso foi coletada de doadores voluntários saudáveis (Comitê de Ética em Pesquisa – COEP da UFMG, protocolo número 0319.0.203.000-11) em tubos com sistema *Vacurette®* contendo citrato (3,2%) e os neutrófilos foram isolados utilizando o protocolo de gradientes de *Histopaque* (*Histopaque 1077* e *1119 - Sigma-Aldrich*) (Vago *et al.*, 2016). Após a adição de 3 mL de *Histopaque 1119* seguida de 3 mL de *Histopaque 1077* em tubos *Falcon™* de 15 mL, foram adicionados 6 mL de suspensão preparada com 3 mL de meio RPMI 1640 e 3 mL de sangue citratado. Os tubos foram então centrifugados a 1.300 RPM durante 30 minutos, com desaceleração nula. A camada de neutrófilos foi recolhida com auxílio de pipeta Pasteur estéril (*BD Bioscience*), sendo novamente lavados em meio RPMI 1640 e centrifugados a 1.500 RPM por 15 minutos.

4.1.5 Experimentos *in vitro* para avaliar a migração de mononucleares e neutrófilos

A migração celular induzida por Ang-(1-7) foi analisada por quimiotaxia utilizando-se placas Transwell de 24 poços (*Corning Incorporated, Corning, NY*) com membranas de policarbonato com tamanho de poro de 5,0 μm . Células RAW 264.7 foram suspensas em DMEM e BMDMs em RPMI sem SFB na concentração de 5×10^5 células/mL e 100 μL destas foram adicionados ao compartimento superior de cada poço. Ang-(1-7) (30-300ng experimentos de dose resposta e 100ng demais experimentos) ou CCL2 (quimiocina quimioatraente padrão para células mononucleares - 100ng) ou meio, foram adicionados aos compartimentos inferiores e as células foram permitidas migrar durante 4 horas a 37°C. As membranas de policarbonato foram fixadas e coradas com hematoxilina (*Accustain; Sigma*). Em alguns grupos, as células foram pré-incubadas com o antagonistas de CCR2, RS504393 (10 μM) ou de MasR (A779 -0.1-10 μM) ou os inibidores de MEK/ERK Selumetinib e U0126 (10 e 15 μM , respectivamente) por 60 min. antes dos experimentos.

Para avaliar o efeitos da Ang-(1-7) sobre a migração de neutrófilos, alíquotas da suspensão celular contendo 1×10^6 células/mL foram adicionadas ao compartimento superior da Câmara de Boyden sobre uma membrana com diâmetro médio de poro de 3 μM . Em outro experimento os neutrófilos foram primeiro pré-tratados com Ang-(1-7) (300 nM/mL) durante 1 hora para depois se proceder ao ensaio de quimiotaxia. Nos compartimentos inferiores da Câmara foram adicionados somente meio de cultura (RPMI) ou meio contendo o agente quimiotático fMLP (10^{-9}M). O sistema foi incubado por 1 hora (atmosfera úmida, 37 °C, 5% CO₂) e, após este período, a membrana foi removida para posterior fixação e coloração com Panótico. As contagens de células foram realizadas com uma ampliação de 100X. Os experimentos foram realizadas em triplicatas experimentais e foram repetidos ao menos 3 vezes.

4.2. Determinação da expressão das quimiocinas CCL2 e CCL5 por ELISA

Os níveis de CCL2 e CCL5 foram dosados nos sobrenadantes congelados, obtidos a partir da primeira centrifugação das células do lavado pleural e tecido periarticular do joelho, pela utilização de kits de ELISA murino da R&D Systems (*DuoSet*). Na realização do ensaio, cada anticorpo de captura foi diluído em PBS 1X e pipetado na placa de 96 poços. Na sequência, a placa foi vedada e incubada a 4°C em geladeira por 18-24 horas. Ao término da sensibilização, a placa foi lavada com solução de PBS-Tween 0,1% e bloqueada por 2 horas com solução a 1% de BSA em PBS 1X, sob agitação. Posteriormente, procederam-se novas lavagens com PBS-Tween 0,1% e paralelamente foi preparada a diluição seriada da curva padrão. Foram pipetados o padrão, o branco (ambos em duplicata) e as amostras (em triplicata) na placa que, na sequência, foi vedada e incubada, novamente a 4°C em geladeira por 18-24 horas. Após outras lavagens, o anticorpo de detecção (diluído em 0,1% de BSA/PBS) foi adicionado à placa e esta foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e a detecção foi realizada pela adição de estreptavidina conjugada a peroxidase ("*HRP-StreptavidinPharmingem*" - 1:4000) em cada poço com posterior incubação a temperatura ambiente, por 30 minutos, sob agitação. A revelação ocorreu após novas lavagens e adição do substrato OPD (*o-phenylenediaminedihydrochloride*) (*Sigma*). Após cerca de 20 minutos as reações foram interrompidas com H₂SO₄ (1M). A leitura foi realizada no espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) no comprimento de onda de 490nm. As colorações obtidas pelas reações foram diretamente proporcionais às concentrações da quimiocina nas amostras analisadas. A absorbância obtida pela leitura foi comparada a curva padrão contendo a concentração conhecida da quimiocina analisada fornecida pelo kit.

4.3. Western Blot para análise da ativação de ERK1/2 por fosforilação

4.3.1. Obtenção dos extratos protéicos

Células RAW foram lavadas com PBS 1X e lisadas pela adição de 100µL de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2

mM de EDTA, 1 mM de NaVO₃, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 200 mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina), e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10.000 RPM em microcentrífuga por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante aliquoteado e guardado à -20°C até o momento de uso.

4.3.2. Quantificação dos extratos protéicos

Para realizar a dosagem de proteínas totais foi utilizado o kit *Bio-Rad Protein Assay* (*Bio-Rad Laboratories*) baseado no método de Bradford. O ensaio foi realizado em uma microplaca de 96 poços (NUNC™), e consistiu na adição de 2 µL de cada amostra a 200 µL do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente foi confeccionada uma curva padrão utilizando como solução padrão BSA 1mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura foi feita em espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) a 595 nm. As absorbâncias das amostras foram comparadas com as absorbâncias da curva padrão, e as concentrações calculadas e expressas em mg/mL (ou µg/µL).

4.3.3. Fracionamento eletroforético e transferência

Os extratos protéicos totais (30 µg) foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão LB 5X (10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250 M Tris/HCl pH 6,8) e a mistura mantida a 100°C por 5 minutos. Os extratos protéicos foram fracionados em gel de 10% de poli(acrilamida)/SDS. Ao final da corrida, foram transferidos para membrana de nitrocelulose (*Hybond™ ECL™, GE Healthcare*).

4.3.4. Imunoblot e revelação

As membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado por uma hora. Em seguida, elas foram lavadas com PBS-

Tween, e incubadas com o anticorpo de interesse a 4°C overnight. Após nova lavagem com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente com o respectivo anticorpo secundário ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL™ (*GE Healthcare*) e expostas contra filme de raio X (*Hyperfilm ECL™, GE Healthcare*). O filme foi revelado utilizando-se revelador e fixador (Kodak), conforme indicações do fabricante. Os anticorpos utilizados foram: anti-P-Erk1/2 1:1000 (*CellSignaling Technology*) e anti-β-actina 1:10000 (*Sigma-Aldrich*) e anticorpos secundários conjugados com peroxidase - anti-rabbit 1:3000 e anti-mouse 1:3000 (*Santa Cruz Biotechnology*). As análises densitométricas foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

4.4 Animais

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo CEUA 295/2018) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo COEP: 0319.0.203.000-11). Foram utilizados camundongos BALB/c machos, entre 8–10 semanas de idade provenientes do Biotério Central da UFMG. Os animais *knockout* para o receptor Mas foram cedidos em colaboração pelo professor Dr. Robson Santos (Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas - UFMG). Os animais foram mantidos em condições padronizadas de luminosidade, temperatura e umidade (12:12h claro-escuro, 22 ± 1°C, 50-60%) tendo livre acesso (*ad libitum*) à água e ração.

4.5. Migração de leucócitos na cavidade pleural induzida por Ang-(1-7)

Os camundongos receberam uma administração intrapleural (i.pl.) de Ang-(1-7) (100 ng/cavidade) ou PBS. Células da cavidade pleural foram colhidas em diferentes momentos após a injeção de Ang-(1-7) lavando-se a cavidade com 1 ml de PBS/BSA/EDTA. Em alguns experimentos foram utilizados inibidores de CCR2 (RS504393- 2mg/kg) (conforme Carmo *et al.*, 2014) ou do receptor Mas (A779 – 200 ng/cavidade) (conforme Barrosso *et al.*, 2017) sendo as drogas injetadas 1h antes

da injeção de Angio-(1-7). A contagem total de células foi realizada em uma câmara de Neubauer modificada usando a coloração de Turk. As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em lâminas preparadas em citospin (*Shandon III*) coradas com May-Grünwald-Giemsa e utilizando-se critérios morfológicos padrão para identificar tipos celulares. Os resultados são apresentados como o número de células por cavidade.

4.6. Análise do perfil fenotípico dos leucócitos recrutados para a pleura após a injeção de Ang-(1-7) por citometria de fluxo

O perfil fenotípico dos leucócitos recrutados para a pleura após a injeção de Ang-(1-7) foi avaliado por citometria de fluxo. Para isso, células presentes na cavidade pleural foram coletadas 48 h após o desafio com Ang-(1-7) ou PBS, contadas, plaqueadas e marcadas com anticorpos fluorescentes contra F4/80 (PEcy7, *eBioscience*), Ly6C (APCCy7, *eBioscience*), Ly6G (APC, *eBioscience*), CD3 (BV421, *eBioscience*). Células marcadas foram adquiridas no equipamento BD FACSCanto II (*BD Bioscience*) e analisadas através do Software *FlowJo (Tree Star)*. Como estratégia para caracterização dos leucócitos, foram considerados macrófagos, células F4/80 positivas, neutrófilos, Ly6G positivas, monócitos, Ly6C positivas, F4/80 negativas, e linfócitos, CD3 positivas.

4.7. Modelo murino de pleurisia induzida por LPS

Camundongos foram desafiados com LPS (*E. coli* sorotipo O:111:B4 – *Sigma-Aldrich*) (500ng/cavidade) ou solução salina (NaCl 0,9%). Posteriormente, as células foram recuperadas da cavidade pleural, lavando-se esta cavidade 2 vezes com 1 mL de PBS contendo EDTA (1 mM).

4.8. Contagem total e diferencial de células

Células da cavidade pleural foram centrifugadas a 1.200 R.P.M., por 5 minutos, a 4°C em centrífuga (*ThermoScientific*) e o sedimento celular ressuspensão

em 200µL de BSA 3% (p/v) diluído em PBS 1X. Uma alíquota das células foi diluída 10 vezes na solução de lise de hemácias (*Solução de Turk - Imbralab*) e, utilizando-se uma câmara de Neubauer, foi realizada a contagem total de células. A partir dessa contagem, as células foram cito-centrifugadas a 450 R.P.M., por 5 minutos, com as células ressuspensas em 100µL de BSA, de forma que cada lâmina contivesse aproximadamente 100 mil células. Após a secagem das lâminas, essas foram coradas com o método de May-Grünwald-Giemsa utilizando o kit Panótico Rápido (*LB Laborclin*), para a realização da contagem diferencial de células no microscópio ótico (no aumento de 100 vezes). As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, por meio de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células a cada contagem.

4.9. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (*Oneway ANOVA*), seguida do teste *Newman-Keuls*, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0.05$. Os resultados são apresentados como média \pm EPM (Erro Padrão da Média). As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o Software *GraphPadPrism 6.0*.

5. RESULTADOS

5.1 - Ang-(1-7) induz quimiotaxia de monócitos humanos e macrófagos murinos dependente do receptor Mas

Experimentos com culturas de células RAW 264.7 submetidas ao ensaio de quimiotaxia, utilizando-se diferentes concentrações de Ang-(1-7) (30, 100 e 300 nM), demonstraram que este peptídeo foi capaz de induzir maior migração celular quando comparada às células não tratadas. Também foi evidenciado que a migração é concentração-dependente, uma vez que, quanto maior a concentração de Ang-(1-7) maior o número de células que migraram (**Figura 5A**), sendo que as concentrações de 100 e 300 nM apresentaram atividade quimiotática semelhante à quimiocina CCL2, usada como padrão para o teste.

Como já descrito na literatura, a Ang-(1-7) exerce seus efeitos por meio do receptor Mas, o qual é acoplado à proteína G (Santos *et al.* 2003). Dessa forma, buscou-se avaliar se este receptor estaria envolvido na migração celular induzida pela Ang-(1-7). Para tal, foi realizado o pré-tratamento das células com diferentes concentrações do antagonista do receptor Mas, denominado A779 (0,1 – 10 μ M). Tais experimentos demonstraram que o A779 foi capaz de abolir a migração induzida pela Ang-(1-7) em culturas de células RAW 264.7, evidenciando a participação deste receptor na migração celular induzida por Ang-(1-7). Tal efeito não se mostrou concentração dependente, uma vez que mesmo concentrações muito baixas do inibidor foram efetivas em inibir o efeito de migração induzido por Ang-(1-7) (**Figura 5B**).

Sabendo que a Ang-(1-7) foi capaz de induzir quimiotaxia em macrófagos murinos, quisemos investigar se o mesmo seria válido para monócitos humanos. De forma interessante, Ang-(1-7) também foi capaz de induzir a migração *in vitro* de monócitos humanos (**Figura 5C**). Em todos os experimentos, Ang-(1-7) apresentou potência quimioatrativa semelhante à quimiocina MCP-1/CCL2, utilizada como padrão.

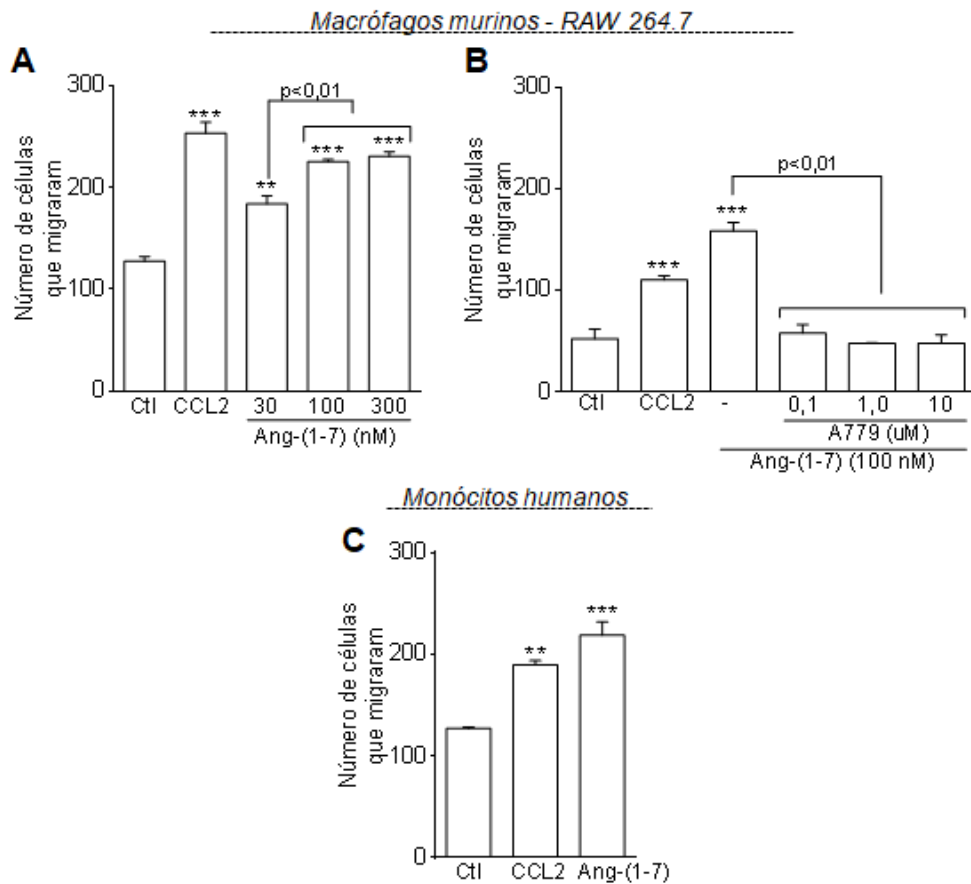


Figura 4: Ang-(1-7) induz a migração de células mononucleares. As células RAW 264.7 foram incubadas durante 4h e permitidas migrar através de membranas de policarbonato usando Ang-(1-7) como quimioatratante em diferentes concentrações (30 – 300 nM/poço) (A). O mesmo tipo de ensaio foi conduzido utilizando monócitos humanos (C). A quimiocina CCL2 (100ng) foi utilizada como controle positivo. Em (B), efeito do pré-tratamento das células com diferentes concentrações do antagonista do receptor Mas, A779. Em B e C utilizou-se 100 nM de Ang-(1-7) como quimioatratante. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. Os resultados são expressos como o número de células que migraram e são apresentados como média \pm EPM de, pelo menos, cinco campos aleatórios.

5.2 - Ang-(1-7) não induz quimiotaxia de neutrófilos humanos

A resolução da inflamação requer o término da resposta inflamatória principalmente pela diminuição do recrutamento de granulócitos, mudança na produção de mediadores pró-inflamatórios para pró-resolutivos, desligamento de vias de sinalização associadas à sobrevivência de leucócitos, ativação de vias associadas à apoptose e recrutamento não flogístico de macrófagos, seguido de reprogramação dessas células para fenótipos pró-resolutivos (Sousa *et al.* 2013).

Os resultados dos experimentos realizados em macrófagos murinos (RAW 264.7) e monócitos humanos mostram que a Ang-(1-7) é capaz de induzir a quimiotaxia dessas células (**Figura 5**). Paralelamente, foram realizados ensaios de quimiotaxia com neutrófilos humanos. Tais ensaios foram conduzidos de duas maneiras: primeiramente, a Ang-(1-7) foi utilizada como quimioatraente na parte de baixo da Câmara de Boyden (**Figura 6A**). Podemos observar que a Ang-(1-7) não foi capaz de induzir migração dessas células, uma vez que o número de células que migraram foram semelhante ao número de células que migraram sem presença de estímulo quimiotático na parte inferior da câmara. Por outro lado, o agente quimiotático padrão utilizado aqui - fMLP (10^{-9} M) induziu a quimiotaxia de neutrófilos como esperado (**Figura 6A**). Em seguida, nos perguntamos se a incubação prévia de neutrófilos com Ang-(1-7) poderia inibir a migração/quimiotaxia destas células em direção ao agente quimiotático padrão (fMLP). Assim, neutrófilos humanos foram pré-incubados durante 1h com Ang-(1-7) e em seguida permitidos migrar através de membranas de policarbonato. (**Figura 6B**). De forma interessante, Ang-(1-7) foi capaz de diminuir a migração espontânea (em direção ao meio controle) e induzida por fMLP, apontando para um efeito deste peptídeo na modulação de estruturas/proteínas de neutrófilos envolvidas com a migração destas células. Em conjunto, os dados apresentados até o momento apontam para uma ação seletiva de Ang-(1-7) na indução da migração de monócitos/macrófagos e, por outro lado, na inibição da quimiotaxia de neutrófilos em presença de estímulo flogístico como o fMLP.

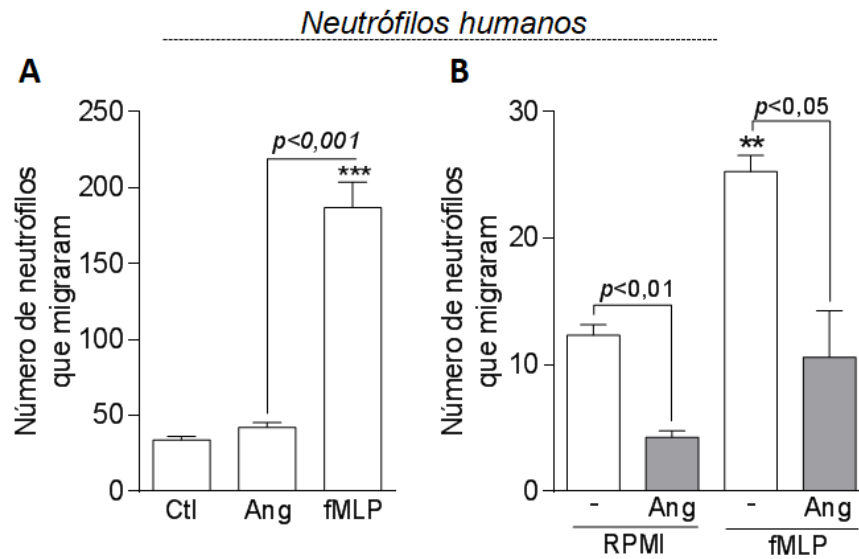


Figura 5: Efeito da Ang-(1-7) na quimiotaxia de neutr3filos humanos. Neutr3filos humanos foram isolados a partir de sangue perif3rico humano e em seguida permitidos migrar em membranas de policarbonato (tamanho do poro igual a 3 μ m) durante 1 h, utilizando como quimioatraentes Ang-(1-7) (300 nM/poço) e fMLP (10⁻⁹M/poço). RPMI foi usado como controle negativo (A). Em (B) os neutr3filos foram pré-tratados por 1 hora com Ang-(1-7) (300 nM) e depois permitidos migrar em membranas de policarbonato. fMLP e RPMI foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Os resultados são expressos como o número de células que migraram e são apresentados como média \pm EPM de, pelo menos, cinco campos aleatórios. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

5.3 - Ang-(1-7) induz quimiotaxia de macrófagos dependente de CCR2

A quimiocina MCP-1/CCL2 atua principalmente no receptor CCR2 e é um importante quimioatraente de células mononucleares. Com o intuito de se avaliar a participação desta quimiocina na migração de macrófagos induzida pela Ang-(1-7), foram conduzidos experimentos com células RAW 264.7, realizando-se o pré-tratamento com o antagonista do receptor CCR2, denominado RS504393. Após 1h, as células foram incubadas durante 4h a 37°C e permitidas migrar através de membranas de policarbonato em direção a um gradiente quimiotático constituído de Ang-(1-7) (100 nM) ou da quimiocina MCP-1/CCL2 (100 ng/mL – controle positivo) (**Figura 7A**). Observou-se que o antagonismo de CCR2 com RS504393 inibiu a migração induzida pela Ang-(1-7). O mesmo tipo de ensaio foi conduzido com BMDMs obtidos de camundongos deficientes ou não para o gene que codifica CCR2 (CCR2^{-/-}) (**Figura 7B**). Verificou-se que o número de macrófagos CCR2^{-/-} que migraram foi menor quando comparado ao grupo WT (*wild-type*). Além de CCL2, CCL3 (outra quimiocina que se liga a CCR2) também foi utilizado como quimioatraente, porém nenhuma dessas quimiocinas foi capaz de induzir migração

nas células provenientes de animais deficientes para o receptor CCR2. Ambos os resultados sugerem que o eixo CCL2/CCR2 possui um papel importante na migração de células mononucleares induzida por Ang-(1-7).

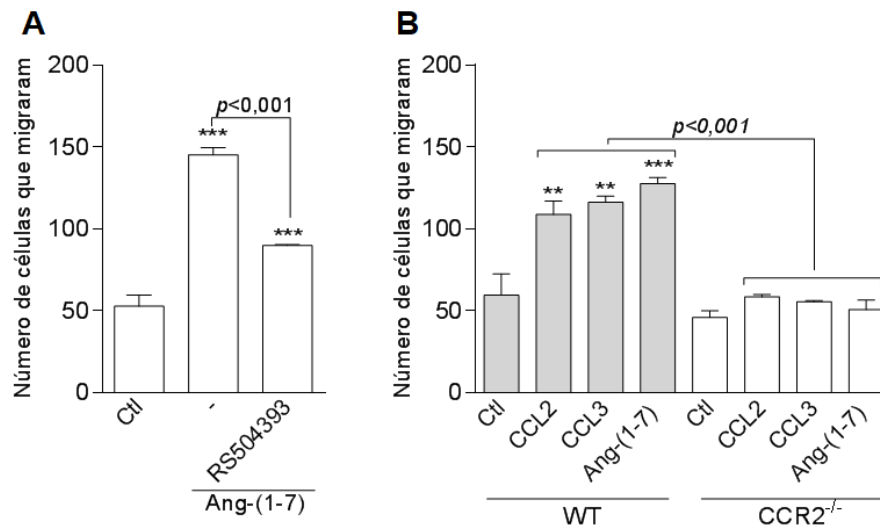


Figura 6: Efeito do receptor CCR2 na migração de macrófagos murinos induzida por Ang-(1-7). Células RAW 264.7 foram pré-tratadas durante 1h com o antagonista seletivo de CCR2 (RS504393 – 10 μ M) e depois foi realizado o ensaio de quimiotaxia, em que as células foram permitidas migrar em membranas de polycarbonato durante 4h, usando Ang-(1-7) como quimioatraente (100 nM/poço) (A). Em (B), BMDMs isolados de medula óssea de camundongos WT e deficientes para o receptor CCR2, foram permitidos a migrar em membranas de polycarbonato sob diferentes estímulos quimiotáticos como CCL2 (100 ng/mL), CCL3 (100 ng/mL) e Ang-(1-7) (100 nM/poço). Os resultados são expressos como o número de células que migraram e são apresentados como média \pm EPM de, pelo menos, cinco campos aleatórios. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

5.4 - Ang-(1-7) induz migração de macrófagos de forma dependente da via MEK/ERK

Já é bem estabelecida na literatura a participação da via MEK/ERK na migração celular (Carmo *et al.*, 2014; Sepe *et al.*, 2013). Assim, buscou-se avaliar se esta via também estaria envolvida na migração celular induzida pela Ang-(1-7). Inicialmente, avaliou-se se Ang-(1-7) induziria a ativação de ERK1/2 (a cinase *downstream* de MEK). Para tal, foi realizada uma cinética de tratamento com Ang-(1-7) na concentração de 100ng/mL e os experimentos revelaram que este peptídeo induz a ativação de ERK1/2 (avaliado por meio de detecção da proteína fosforilada) (Figuras 8A e B).

De forma interessante, também mostramos a capacidade de Ang-(1-7) de induzir a ativação de duas cinases de adesão focal Fak e Paxilina (Figura 8A), que

são envolvidas no processo de migração celular e tem sua expressão dependente da via MEK/ERK (Teranishi *et al.*, 2009). Posteriormente, foi realizado o pré-tratamento das células com dois diferentes inibidores de MEK/ERK, denominados Selumetinibe (10 μ M) e U0126 (15 μ M). Tais experimentos demonstraram que ambos os inibidores foram capazes de abolir a migração de RAW induzida por Ang-(1-7), evidenciando o envolvimento da via MEK/ERK na migração celular induzida pela Ang-(1-7) (**Figuras 8C, D e E**).

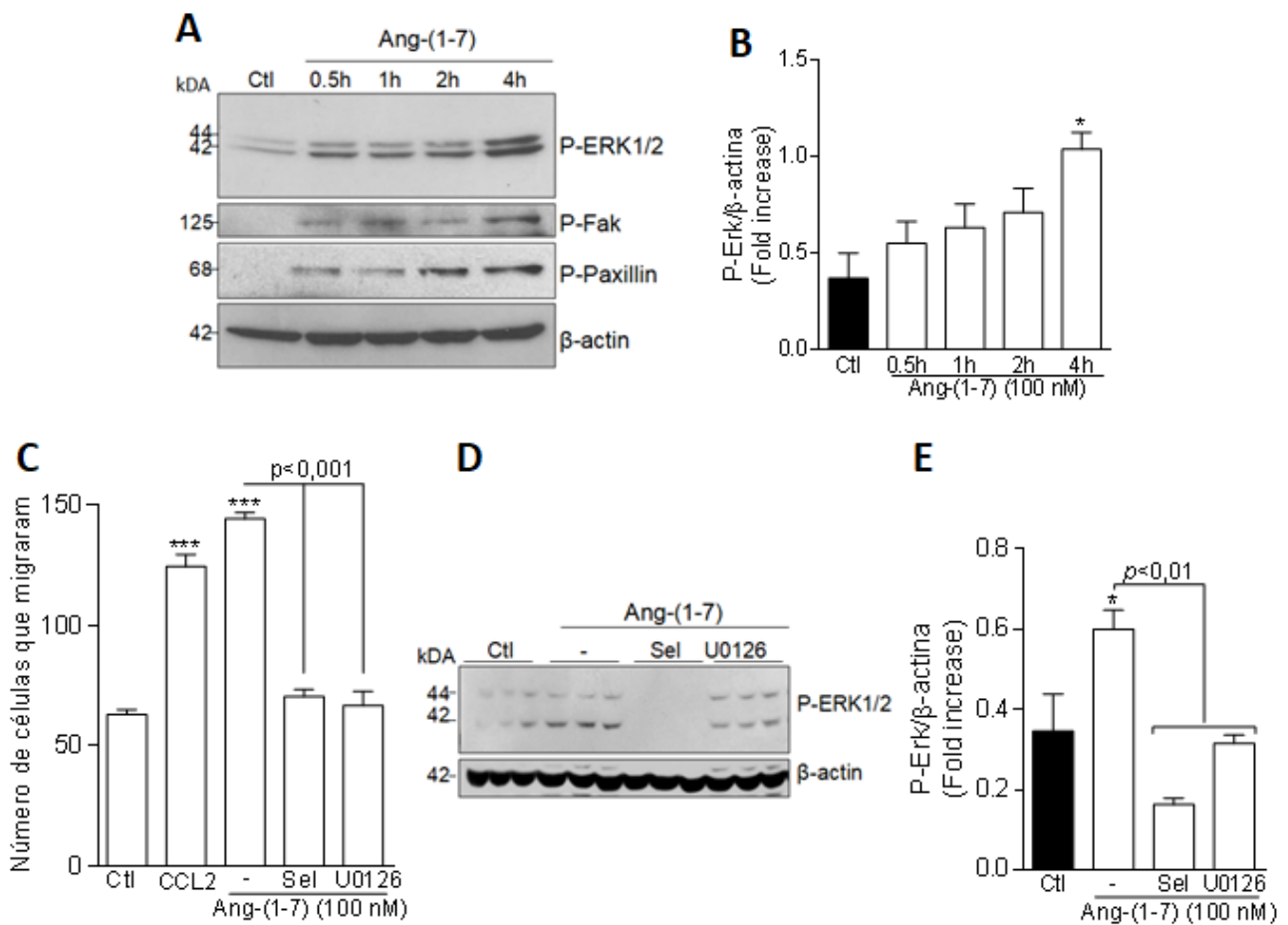


Figura 7: Efeito do pré-tratamento com os inibidores de MEK/ERK, Selumetinibe e U0126, na migração de macrófagos induzida por Ang-(1-7). Células Raw 264.7 foram tratadas por diferentes tempos com Ang-(1-7) (100 nM/poço) ou PBS 4h. Os extratos celulares foram obtidos e submetidos à análise de Western Blot para detecção de proteínas envolvidas na migração celular: P-ERK1/2, P-Fak e P-Paxilina (A). Em outro experimento, as células foram pré-tratadas durante 1h com 10 μ M de Sel e 15 μ M de U0126 e posteriormente foram permitidas migrar através de membranas de polycarbonato usando Ang-(1-7) como quimioatratante (100 nM/poço) (C). Os resultados são expressos como o número de células que migraram e são apresentados como média \pm EPM de, pelo menos, cinco campos aleatórios. Em D, as células foram pré-tratadas com os inibidores de MEK/ERK e posteriormente incubadas com Ang-(1-7) (100nM) por 4 horas e analisadas quanto à P-ERK1/2. Análise por densitometria utilizando o Software ImageJ (B e E). Para controle da quantidade de proteína aplicada nas diferentes canaletas, as membranas foram incubadas com anti- β -actina. * $p < 0,5$ *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

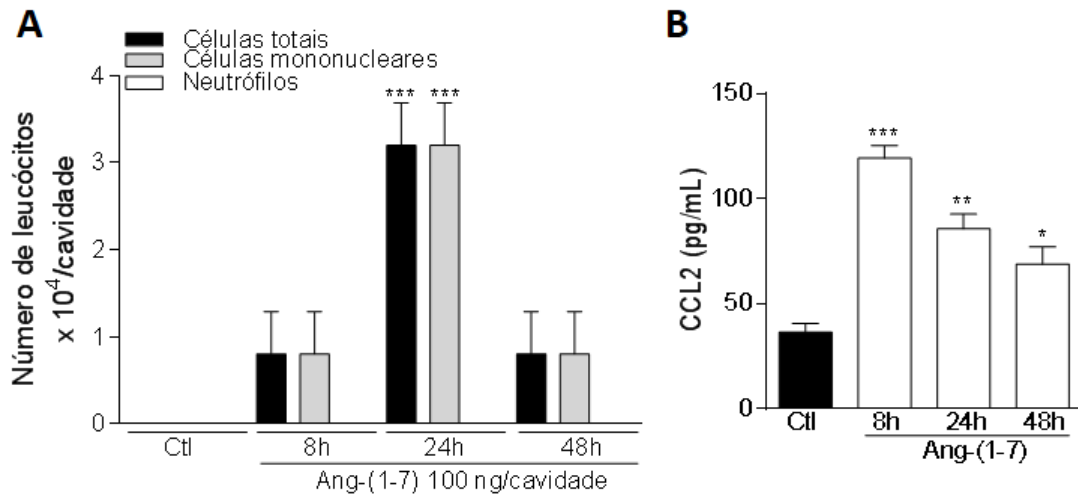
5.5 - Ang-(1-7) induz a migração de leucócitos *in vivo*

Para avaliar a habilidade da Ang-(1-7) de induzir migração de leucócitos, bem como, para avaliar a cinética do influxo leucocitário *in vivo*, Ang-(1-7) (100 ng/cavidade) foi injetado em duas diferentes cavidades: no joelho e na pleura de camundongos. O desafio com Ang-(1-7) foi capaz de promover o influxo celular para ambas as cavidades, com aumento significativo do número de células no tempo de 24h na cavidade articular (**Figura 9A**) e 48 h na cavidade pleural (**Figura 9C**). Observando-se as contagens de mononucleares e comparando-as aos perfis das contagens totais, pode-se inferir que a migração induzida pela Ang-(1-7) foi praticamente exclusiva de mononucleares, não havendo, portanto, recrutamento de neutrófilos para as cavidades nos tempos analisados.

Devido à importância das quimiocinas CCL2 e CCL5 para a migração de células mononucleares, os níveis destas foram mensurados nos lavados obtidos da pleura e cavidade articular dos animais após a injeção de Ang-(1-7). Pode-se observar que a Ang-(1-7) foi capaz de induzir a elevação dos níveis de CCL2 em ambas as cavidades, com pico de 8h na cavidade articular e de 48h na cavidade pleural (**Figuras 9B e D**). Não houve alteração dos níveis de CCL5 em ambas as cavidades (dado não apresentado).

Dado que a injeção de Ang-(1-7) na cavidade articular não oferece um número suficiente de células para a investigação dos mecanismos subjacentes a migração de células mononucleares, demos prosseguimento às análises de mecanismos utilizando o modelo de injeção na cavidade pleural. Nesta cavidade o número de células recuperadas é bem maior, tornando viáveis as análises por western blot e por citometria de fluxo. Assim, as células recuperadas do ensaio mostrado na **Figura 9C** foram analisadas quanto à cinética de ativação e ERK1/2 e observou-se aumento de fosforilação desta proteína, temporalmente associado ao aumento do número de mononucleares na cavidade pleural (**Figuras 9E**).

Cavidade articular



Cavidade pleural

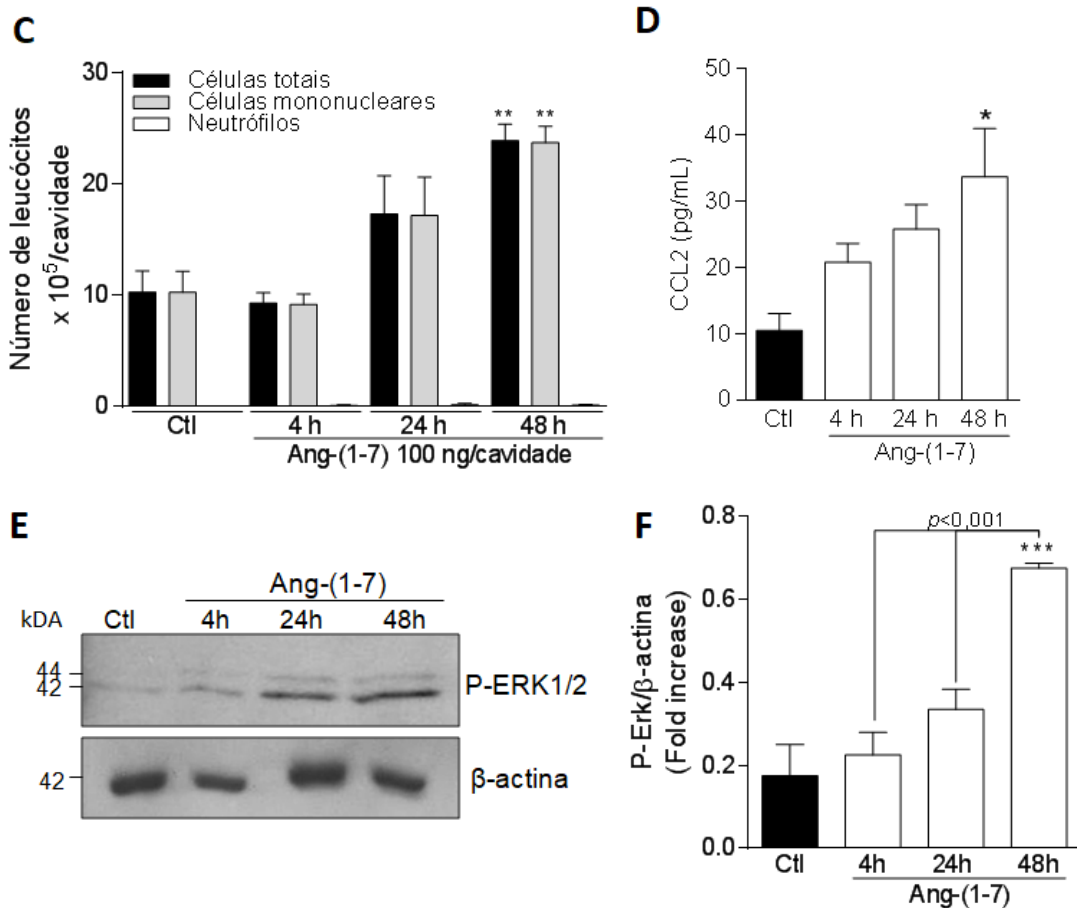


Figura 8: Cinética do recrutamento de leucócitos *in vivo* após injeção de Ang-(1-7). Camundongos Balb/c foram desafiados com uma injeção intra-articular (A-B) ou intrapleural (i.pl.) (C-F) de Ang-(1-7) (100 ng/cavidade) ou PBS (veículo). As células que migraram para as respectivas cavidades foram coletadas em diferentes tempos após a injeção e processadas para contagem total e diferencial de leucócitos (A e C). Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para análises dos níveis de CCL2 por ELISA (B e D). As células do exsudato foram lisadas e os níveis de P-ERK1/2 foram avaliadas por Western Blot (E). Em (F) análise densitométrica utilizando o Software ImageJ. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado aos camundongos injetados com PBS (controle).

5.6 - Perfil fenotípico dos leucócitos que migraram para a pleura após o desafio com Ang-(1-7)

Com o objetivo de elucidar de forma mais contundente o perfil dos leucócitos recrutados após 48h do desafio com Ang-(1-7), foram realizados experimentos de citometria de fluxo utilizando-se os marcadores F4/80, que caracterizam monócitos/macrófagos, Ly6G que caracterizam neutrófilos, além das marcações para a população de monócitos (Ly6C) e linfócitos (CD3). Na **figura 10A** são apresentados as estratégias de gates para as diferentes populações celulares. Nestas análises houve um aumento estatisticamente significativo na porcentagem de monócitos (células Ly6C⁺/F4/80⁻) após injeção de Ang-(1-7), quando comparados ao veículo (PBS) (**Figura 10B**). Não houve aumento significativo das demais populações celulares após a injeção de Ang-(1-7).

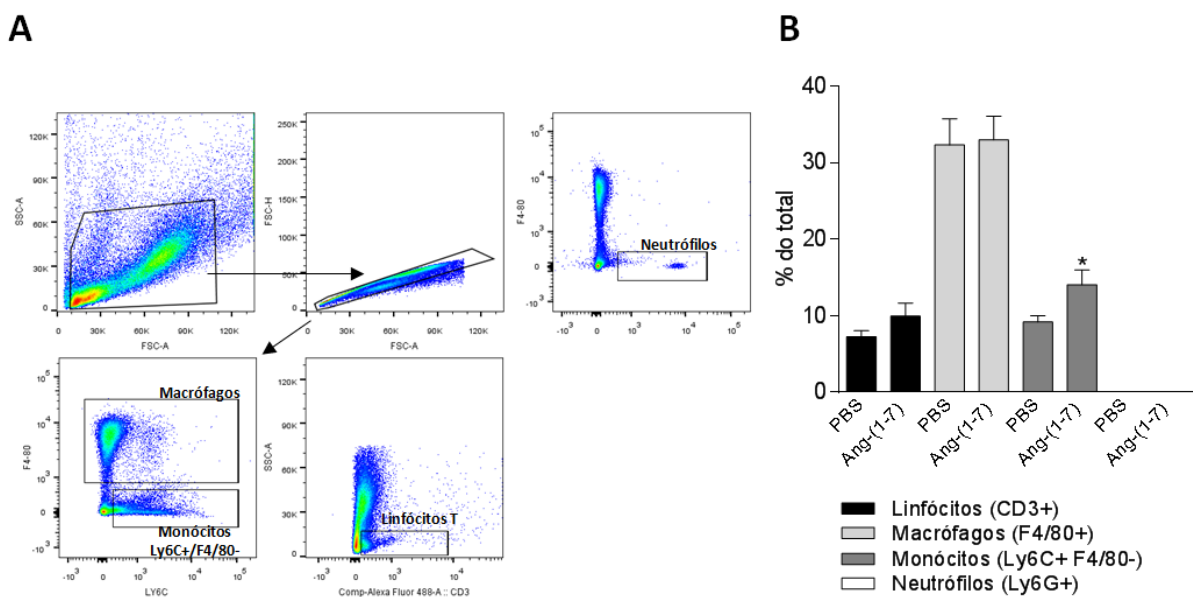


Figura 9: Perfil fenotípico dos leucócitos encontrados na pleura de animais desafiados com Ang-(1-7). Camundongos Balb/c foram desafiados pela via intrapleurar com uma injeção de Ang-(1-7) (100 ng/mL) ou PBS (veículo). As células que migraram para a cavidade foram coletadas após 48h e processadas para análise do perfil celular por citometria de fluxo. Estratégia de gate utilizada na citometria (A) e perfil de expressão dos marcadores expressos por leucócitos recrutados para a pleura após o desafio com Ang-(1-7) (B). Os resultados foram expressos em número de células por cavidade e mostrados como média \pm EPM de oito animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparados com os camundongos desafiados com PBS (veículo).

5.7 - Os receptores CCR2 e Mas estão envolvidos na migração de células mononucleares *in vivo*

A partir dos resultados anteriormente obtidos, nos quais a Ang-(1-7) promoveu aumento nos níveis de CCL2 e sabendo que esta quimiocina é um importante quimioatraente para monócitos e linfócitos, atuando principalmente no receptor CCR2 (Kuziel *et al.*, 1997), foram realizados experimentos *in vivo*, em que camundongos BALB/c receberam uma injeção intrapleural com o antagonista do receptor CCR2, RS504393 (60µg/cavidade), 1h antes da injeção de Ang-(1-7) (100 ng/cavidade). A participação do receptor Mas na migração de células mononucleares também foi avaliada utilizando o antagonista A779 na dose de 200 ng/cavidade 1h antes da administração de Ang-(1-7).

Em consonância com os dados obtidos *in vitro*, apresentados nas **figuras 5B e 7A**, observou-se que os antagonistas de CCR2 e do receptor Mas inibiram a migração induzida pela Ang-(1-7) (**Figura 11**), sugerindo que o eixo CCL2/CCR2 e o receptor Mas possuem um papel importante na migração de células mononucleares *in vivo* induzidas por este peptídeo.

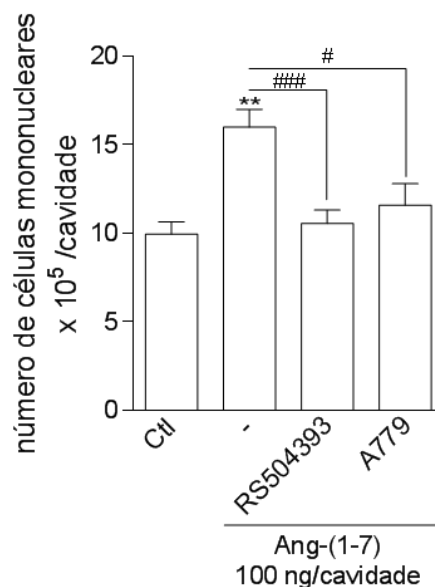


Figura 10: Efeito dos antagonistas de CCR2, RS504393, e do receptor Mas, A779, na migração induzida por Ang-(1-7). Camundongos Balb/c foram pré-tratados com RS504393 (60 µg/cavidade, s.c.) ou A779 (200 ng/cavidade, i.pl.) por 1h com posterior desafio com Ang-(1-7) (100 ng/cavidade, i.pl.). Após 48h as células que migraram para a cavidade foram coletadas e processadas para contagem de leucócitos. Os resultados das contagens foram expressos em número de células mononucleares por cavidade e mostrados como média ± EPM de 5 animais por grupo. ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ quando comparado aos animais tratados com Ang-(1-7).

5.8 - A via MEK/ERK está envolvida na migração celular *in vivo* induzida pela Ang-(1-7).

Uma vez que a via MEK/ERK mostrou-se importante para a migração de macrófagos induzida por Ang-(1-7) (**Figura 8**), que ERK1/2 foi ativada em concomitância com o influxo de células mononucleares para a pleura de camundongos após Ang-(1-7) (**Figura 9E-F**) e ainda, por conhecermos a importância desta via para migração de macrófagos murinos (Carmo *et al.*, 2014), nosso próximo objetivo foi avaliar a importância de tal via na migração *in vivo*, induzida pela Ang-(1-7). Para tanto, os animais foram pré-tratados com o inibidor de MEK/ERK, U0126 (60µg/cavidade) antes da injeção de Ang-(1-7). Pode-se observar um aumento do influxo de células mononucleares induzido pelo tratamento com Ang-(1-7) e a inibição desse influxo no grupo pré-tratado com o U0126, (**Figura 12**).

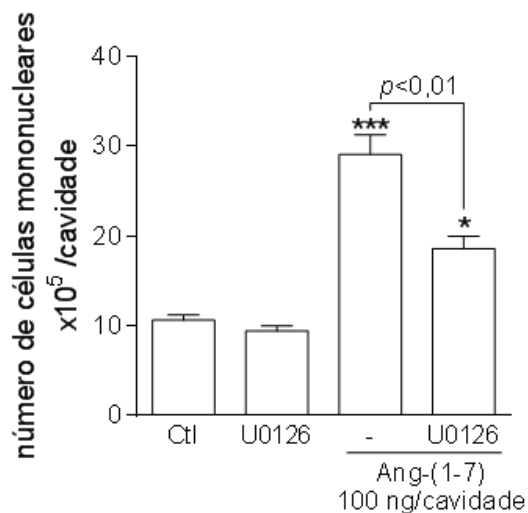


Figura 11: Efeito do tratamento com o inibidor de MEK/ERK, U0126, na migração de células mononucleares induzida por Ang-(1-7) *in vivo*. Camundongos BALB/c foram pré-tratados, pela injeção de U0126 (60µg/cavidade) por 1h. Posteriormente foram desafiados pela injeção de Ang-(1-7) (100 ng/cavidade), via intrapleurale. As células que migraram para a cavidade pleural foram coletadas após 48h e processadas para contagem de leucócitos. Os resultados das contagens foram expressos em número de células mononucleares por cavidade e mostrados como média ± EPM. * $P < 0,05$ *** $P < 0,001$, quando comparados com os camundongos injetados com PBS.

5.9 - Efeito do tratamento com antagonista do receptor Mas (A779) na resolução da pleurisia induzida por LPS

A relevância funcional da Ang-(1-7) endógena foi avaliada utilizando-se o modelo de pleurisia induzida por LPS. Neste modelo, a injeção intrapleural de LPS promove recrutamento de neutrófilos para a pleura com pico entre 8-12h, decaindo nos tempos de 48 em diante. Este é um modelo experimental de inflamação aguda, cuja resolução acontece de forma espontânea no tempo de 48h (Sousa *et al.*, 2010; Vago *et al.*, 2012; Vago *et al.*, 2016). Assim, empregando-se uma estratégia para bloquear a ação da Ang-(1-7) endógena, durante o pico da inflamação, com o antagonista seletivo do receptor Mas, A779, pode-se observar um impedimento da resolução espontânea que acontece no tempo de 48h neste modelo inflamatório (**Figura 13**), sugerindo que a Ang-(1-7) produzida endogenamente faz parte de um programa pró-resolutivo fisiológico.

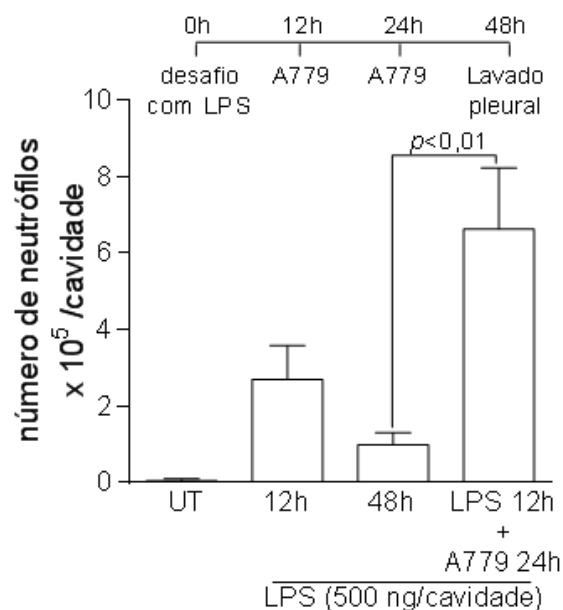


Figura 12: Efeito do tratamento com o antagonista do receptor Mas, A779, na resolução da inflamação aguda natural. Camundongos foram injetados com LPS (500ng/cavidade, i.pl.) ou PBS, sendo que os animais injetados com LPS foram tratados ou não com A779 (100µL, i.p., duas administrações em intervalos de 12h). As células foram coletadas da cavidade pleural nos tempos indicados após desafio com LPS e processadas para contagem de neutrófilos. Resultados são expressos como número de neutrófilos por cavidade ou e são mostrados como média ± EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo de animais injetados com LPS 48h.

5.10 - A deleção genética do receptor Mas ($Mas^{-/-}$) resulta em diminuição do recrutamento de células mononucleares no modelo de pleurisia

A relevância de Angio-(1-7) no modelo de pleurisia induzida por LPS também foi avaliada em camundongos deficientes para o receptor Mas ($Mas^{-/-}$). Para tal, comparamos a cinética da inflamação na pleura entre animais WT e Knockout para MasR. Neste modelo, a resolução espontânea (visto pela queda do número de neutrófilos) que acontece em animais WT no tempo de 48h é acompanhada por aumento de células mononucleares, sendo este evento considerado uma marca de resolução (Vago et al, 2012; Vago et al, 2015). Como esperado, em camundongos WT, o número de células mononucleares recrutadas para a cavidade pleural em resposta à injeção de LPS aumentou no tempo de 48h. Em contraste, o número de células mononucleares recrutadas foi significativamente menor nos animais $Mas^{-/-}$ (**Figura 13A**). De forma contrária ao encontrado com a intervenção farmacológica do receptor com A779 (Figura 12), a deficiência em Mas não resultou em alteração no número de neutrófilos recrutados para a cavidade pleural em ambos os animais, como mostrado na **Figura 13B**.

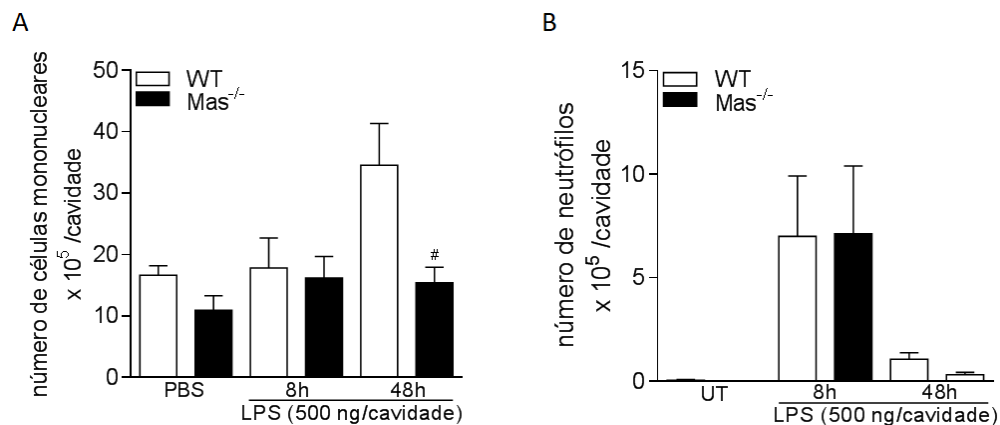


Figura 13: Cinética de influxo de leucócitos em camundongos WT e $Mas^{-/-}$ após injeção de LPS. Camundongos WT e $Mas^{-/-}$ foram injetados com LPS (500 ng/i.pl.) e as células recrutadas para a cavidade foram recolhidas nos tempos 0, 8 e 48h após o desafio. As células foram citocentrifugadas e processadas para contagem diferencial. Resultado do número de células mononucleares (A) e de neutrófilos (B). Os resultados são apresentados como média \pm EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. [#] $P < 0,05$ quando comparado aos camundongos WT injetados com LPS.

6. DISCUSSÃO

As diferentes fases da inflamação são finamente reguladas por mediadores que promovem alterações nas células imunológicas, endoteliais e teciduais resultando nos eventos característicos da resposta inflamatória e nos “sinais cardinais da inflamação e da resolução” (Medzhitov, 2010). Dessa forma, enquanto os mediadores pró-inflamatórios promovem o recrutamento de leucócitos para o tecido inflamado com o propósito fisiológico de eliminar o agente indutor da inflamação, por outro lado, mediadores da resolução induzem eventos que levam ao término da inflamação e ao retorno da homeostase tecidual. Nesse contexto, o estudo dos mecanismos da resolução da resposta inflamatória e das interações existentes entre a inflamação e os diferentes sistemas biológicos, tem levado à constante descoberta de novos mediadores pró-resolutivos (Headland & Norling, 2015). Um melhor entendimento do processo resolutivo da inflamação norteia a busca por futuras estratégias terapêuticas para doenças inflamatórias e fornecem fundamento teórico para o que hoje é descrito como “farmacologia da resolução”. Assim, enquanto atualmente a farmacoterapia da inflamação se baseia em contrapor os eventos da fase produtiva do processo inflamatório, a “farmacologia da resolução” propõe a indução ou agonismo de vias resolutivas com consequente término da inflamação e retorno à homeostase (Perretti *et al.*, 2015).

A migração leucocitária da microcirculação para o tecido é um evento essencial para a resposta imune, caracterizada, principalmente na sua fase produtiva e inata, pela ação de leucócitos polimorfonucleares, mas também pela atuação de macrófagos de perfil pró-inflamatório, de forma a fornecer funções efetoras contra agentes nocivos ao organismo (Petri *et al.*, 2008). Porém, a atuação de células mononucleares, especialmente macrófagos de perfis anti-inflamatórios e pró-resolutivos conduz ao processo de resolução da inflamação (Sousa *et al.*, 2013b; Sugimoto *et al.*, 2017). Dessa forma, é importante estudar os mecanismos e agentes responsáveis pelo recrutamento de células imunes.

Outras moléculas com propriedades pró-resolutivas já foram estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, como, por exemplo, a plasmina (Carmo *et al.*, 2014; Sugimoto *et*

al., 2017) e Anexina A1 (Vago *et al.*, 2012; Vago *et al.*, 2016; Galvão *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2017; Perucci *et al.*, 2017). Além dessas proteínas citadas acima, publicações recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram duas propriedades pró-resolutivas inéditas para o peptídeo Ang-(1-7) – a indução da apoptose de neutrófilos e eosinófilos, seguida da remoção por eferocitose (Barroso *et al.*, 2017; Magalhães *et al.*, 2017). Dessa forma, na busca de um melhor entendimento das propriedades pró-resolutivas deste peptídeo, no presente estudo, buscamos investigar os efeitos da Ang-(1-7) em outros eventos celulares importantes para o processo de resolução. Assim, foram realizados ensaios utilizando experimentação *in vitro* e *in vivo*, visando esclarecer os efeitos exercidos pela Ang-(1-7) sobre a migração de monócitos/macrófagos *in vitro*, bem como para a cavidade pleural e intra-articular de camundongos, e os mecanismos subjacentes a esse processo.

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo que se liga ao receptor Mas (receptor acoplado à proteína G) para exercer suas ações biológicas. Ao longo das últimas décadas foram demonstradas diversas evidências de que este peptídeo apresenta efeitos opostos àqueles verificados pela Ang II, sob condições fisiopatológicas, tais como: vasoconstrição, hipertrofia celular, fibrose, formação de radicais de superóxido, ativação do sistema nervoso simpático, secreção de endotelina e aldosterona (Carey & Siragy, 2003; Grobe, 2006; Iwata *et al.*, 2011; Mercure *et al.*, 2008; Rodrigues-Ferreira *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2010). Tais efeitos podem ser bloqueados pela ligação de um antagonista específico, o A779, ao receptor Mas (Ferrario *et al.*, 1997).

No presente trabalho foi demonstrado, por meio de experimentos com culturas de células RAW 264.7 e monócitos humanos submetidos ao ensaio de quimiotaxia, que a Ang-(1-7) é capaz de induzir migração celular deste tipo celular. Além disso, foi demonstrado também, que esta migração é concentração dependente, uma vez que, quanto maior a concentração de Ang-(1-7) maior o número de células que migraram. Com o intuito de avaliar se o receptor Mas também estaria envolvido na migração celular induzida pela Ang-(1-7), foram feitos experimentos utilizando o pré-tratamento com diferentes concentrações do antagonista do receptor Mas, o A779. Tais experimentos demonstraram que o A779 foi capaz de abolir a migração induzida pela Ang-(1-7) em culturas de células RAW 264.7, mesmo em baixas

concentrações, evidenciando a participação do receptor Mas na migração celular. De forma interessante, os dados obtidos *in vitro* foram confirmados *in vivo*, após a injeção de Ang-(1-7) nas cavidades articular e pleural, sendo também confirmado a participação do receptor Mas neste contexto *in vivo*.

Sabendo que a Ang-(1-7) é capaz de induzir quimiotaxia de macrófagos murinos e monócitos humanos, nos perguntamos qual seria o efeito nos neutrófilos dado o conhecido papel pró-inflamatório do recrutamento deste tipo celular. Assim, neutrófilos isolados do sangue periférico de doadores saudáveis foram submetidos ao ensaio de quimiotaxia de dois modos diferentes: sem pré-tratamento e após 1h de tratamento com Ang-(1-7). Foram utilizadas na parte inferior da câmara de Boyden a Ang-(1-7) e o fMLP, conhecido quimiotrante para neutrófilos. De forma contrária ao seu efeito nos monócitos/macrófagos, Ang-(1-7) não foi capaz de induzir quimiotaxia de neutrófilos e, ainda de forma importante, foi capaz de inibir a migração tanto espontânea (para meio controle) quanto em direção ao fMLP, de neutrófilos que foram previamente incubados com este peptídeo. De fato, em trabalho recente Santuchi e colaboradores (2019) mostraram que animais injetados com LPS e tratados com Ang-(1-7) no pico da inflamação apresentam número reduzido de neutrófilos na cavidade pleural sem redução do número de macrófagos (F4/80⁺/CD11b⁺). Um efeito também observado por Barroso et al. (2017) no modelo inflamatório de AIA. Assim, podemos sugerir que Ang-(1-7) age desativando o neutrófilo, uma vez que a migração em direção a um ambiente quimiotático é uma característica de ativação neutrofílica, e parece exercer uma ação seletiva na indução da migração de monócitos/macrófagos. Experimentos, no contexto de pré-tratamento de macrófagos com Ang-(1-7), anterior a migração em direção a agentes flogísticos serão realizados em breve.

Hammer e colaboradores (2016) mostraram que a deficiência do receptor Mas aumentou a infiltração de macrófagos no modelo experimental de encefalomielite autoimune (EAE), bem como a expressão de genes pró-inflamatórios no baço e medula espinhal. Ainda, ensaios de quimiotaxia conduzidos *in vitro* mostraram que macrófagos peritoneais provenientes de animais deficientes para o receptor Mas apresentaram maior taxa de migração se comparados aos animais WT (Hammer et

al., 2016). De outra forma, foi demonstrado que a ativação do receptor Mas por AVE0991, um análogo sintético de Ang-(1-7), exerce efeitos anti-inflamatórios significativos em modelos de artrite. Nestes sistemas, a infiltração de neutrófilos, os sinais locais de inflamação (dor e edema) e a produção local de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) foram reduzidos, diminuindo o rolamento e a adesão dos leucócitos ao endotélio nas articulações inflamadas (Da Silveira *et al.*, 2013). Esses achados sugerem que a ativação do eixo ACE2/Ang-(1-7)/Mas pode oferecer novas oportunidades terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias (Da Silveira *et al.*, 2013). Um estudo recente de Skiba e colaboradores (2017) mostrou que o agonista sintético de Ang-(1-7), AVE0991, inibiu a inflamação vascular, por meio da redução da expressão de quimiocinas no tecido adiposo perivascular e de ações diretas em monócitos/macrófagos, inibindo sua ativação e polarização em M1. Por meio de estudos *in vivo* e *in vitro*, foi demonstrado que o AVE0991 exibiu propriedades anti-inflamatórias e anti-ateroscleróticas que afetam a diferenciação de monócitos/macrófagos e o recrutamento destas células para o espaço perivascular em estágios iniciais da aterosclerose em camundongos ApoE^{-/-} (Skiba *et al.*, 2017).

Embora os dados de Hammer *et al.* (2016) e Skiba *et al.* (2017) pareçam, a princípio, contraditórios com os dados obtidos no presente trabalho, temos que ter em mente que os dados acima foram obtidos nos modelos experimentais de EAE e de aterosclerose, os quais constituem-se em modelos de inflamação mediada por macrófagos. Nestes contextos, os macrófagos ou já estão em ambiente inflamatório (*in vivo*) ou foram estimulados com agentes flogísticos antes dos experimentos de quimiotaxia. Ainda, nestas experimentações a Ang-(1-7) não foi utilizada como quimiotático e sim em pré-tratamento dos macrófagos antes de migrarem em direção aos quimiotáticos. Aqui, estudamos o recrutamento de monócitos/macrófagos em condições de ausência e um estímulo inflamatório, quer dizer, condições não flogísticas, que poderiam ser comparadas aos eventos desencadeados durante a fase de resolução da inflamação. Diante do exposto acima, Ang-(1-7), parece agir nos macrófagos de forma diferencial, inibindo o recrutamento de leucócitos durante a fase produtiva do processo inflamatório, e promovendo um influxo de monócitos/macrófagos em momentos oportunos da resposta. No entanto, modelos experimentais murinos, em que a migração de monócitos/macrófagos seja

mandatória para uma resolução eficiente, serão necessários para validarmos nossa hipótese.

O receptor CCR2 está envolvido tanto na egressão de monócitos da medula óssea para a corrente sanguínea (Serbina & Pamer, 2006) quanto na migração de células mononucleares do sangue para os tecidos (Kurihara *et al.*, 1997), por meio da ligação da quimiocina CCL2 a este receptor. A quimiocina CCL2 é responsável por regular o recrutamento de monócitos e ativação de subpopulações de linfócitos T (Daly & Rollins, 2003; França *et al.*, 2017).

Para avaliar o papel de CCR2 na migração celular, foram realizados experimentos com células RAW 264.7 realizando o pré-tratamento de 1h com o antagonista do receptor CCR2, RS504393. Observou-se que o bloqueio de CCR2 com RS504393 inibiu a migração induzida pela Ang-(1-7). O mesmo ensaio foi conduzido com BMDMs de camundongos deficientes para o gene que codifica CCR2 (CCR2^{-/-}). Observou-se que o número de células provenientes de camundongos CCR2^{-/-} que migraram foi menor quando comparado ao grupo WT. Ou seja, ambas as estratégias de inibição do receptor, bloqueio farmacológico ou deficiência genética, sugerem que CCL2/CCR2 possui um papel importante na migração de células mononucleares induzidas por Ang-(1-7).

O papel dos receptores CCR2 e Mas também foi investigado *in vivo*. Para isso, camundongos Balb/c receberam injeção com os antagonistas dos respectivos receptores, RS504393 e A779 1h antes da injeção de Ang-(1-7). Após 48h, foi feito o lavado pleural e as células que migraram para a cavidade foram contadas. O uso dos antagonistas aboliu o influxo de células para a pleura dos animais, reforçando nossa hipótese de que a Ang-(1-7) induz um aumento de CCL2, que se liga ao seu receptor CCR2, promovendo migração celular.

Sabe-se que a Ang-(1-7) induz a ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Cerniello *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2010). As MAPKs medeiam mecanismos intracelulares que culminam, principalmente, na ativação de fatores de transcrição, no aumento da expressão gênica e em respostas tróficas (Junttila *et al.*, 2007). A cascata de ativação das MAPKs melhor caracterizada é a via MEK/ERK,

que transmite sinais advindos da membrana celular para o núcleo em resposta a fatores de crescimento e estresse celular. Dessa maneira, estão associadas à proliferação, apoptose e diferenciação celular (Kolch, 2000). Usualmente, a via de sinalização das MAPKs como as proteínas P38 e JNK medeiam, principalmente, as ações em resposta às lesões e ao estresse, enquanto a ERK1/2 é ativada pela estimulação de fatores de crescimento e agentes mitogênicos (Seger & Krebs, 1995).

Sabendo-se da importância da via MEK/ERK para migração de células mononucleares induzida por outros peptídeos (Arthur & Ley, 2013; Carmo et al., 2014; Junttila et al., 2007), buscou-se avaliar se esta via também estaria envolvida na migração celular induzida pela Ang-(1-7). Para isso, foram realizados experimentos utilizando-se dois inibidores de MEK/ERK, o Selumetinibe e o U0126. Por meio desses experimentos mostrou-se que a ativação da via MEK/ERK é imprescindível para os efeitos induzidos pela Ang-(1-7), uma vez que um inibidor específico de MEK/ERK (U0126) suprimiu a migração induzida por Ang-(1-7) *in vitro* (macrófagos murinos).

Com o objetivo de se avaliar se a migração induzida pro Ang-(1-7) também ocorria *in vivo*, foram realizados experimentos nos quais camundongos BALB/c receberam injeção intra-articular e intrapleural de Angio-(1-7). No presente trabalho, foi demonstrado que o desafio com Ang-(1-7) foi capaz de promover o influxo preferencial de células mononucleares para as respectivas cavidades. Na pleura, este influxo foi acompanhado de aumento da fosforilação de ERK1/2. Em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, em que se avaliou as propriedades pro-resolutivas da plasmina, nosso grupo demonstrou que a função do Plasminogênio/Plasmina na migração leucocitária foi seletiva para células mononucleares, sem induzir migração de neutrófilos ou linfócitos para a cavidade pleural (Carmo et al., 2014), da mesma forma que observamos aqui após a injeção de Ang-(1-7).

Para identificar as populações celulares que migraram para a cavidade, analisamos as células recrutadas pela expressão de marcadores de superfície como CD45, F4/80, CD3, Ly6C e Ly6G. Nossos resultados mostram que a maioria das células que migram em resposta ao estímulo de Ang-(1-7) são Ly6C⁺/F4/80⁻, marcadores de monócitos. Não houve alteração no número de macrófagos recrutados se

comparado ao grupo controle. Confirmando as contagens pleurais das lâminas de cytospin, a análise de citometria de fluxo mostrou que a injeção de Ang-(1-7) não foi capaz de aumentar a frequência de neutrófilos ou linfócitos na cavidade pleural quando comparada com camundongos injetados com PBS. Embora não tenhamos mostrado aqui, em um ensaio preliminar, em que foi realizada caracterização fenotípica dos macrófagos recrutados após a injeção de Ang-(1-7) não foi observado modificação dos perfis destes macrófagos em relação ao grupo PBS. Embora o dado em questão ainda necessite ser repetido, o mesmo está em consonância com o recente trabalho de Santuchi e colaboradores (2019), o qual mostra que a Ang-(1-7) *per se* não foi capaz de modificar o perfil de macrófagos M0 *in vitro*. Da mesma forma, não houve modificação na expressão de marcadores de macrófagos M2 (como arginase-1 e MRC1) e M1 (iNOS) após o tratamento de BMDMs em cultura com Ang-(1-7) por um período de 24 h. No entanto, BMDMs diferenciados ao perfil M1 com IFN/LPS e pré-tratados com Ang-(1-7) foram reprogramados para um perfil anti-inflamatório com aumento de marcadores para M2 e diminuição da produção de TNF-a (Santuchi *et al.*, 2019).

Dada a participação dos macrófagos em vários eventos que acontecem durante o processo de resolução da inflamação (Dalli & Serhan, 2017), quisemos investigar a importância da Ang-(1-7) endógena na resolução da resposta inflamatória espontânea. Para tal, foi utilizado o modelo murino de pleurisia induzida por LPS (lipolissacarídeo), em que camundongos BALB/c foram injetados com LPS por via intrapleural. A participação de Ang-(1-7) foi avaliada de duas formas: pelo bloqueio farmacológico do receptor Mas utilizando o A779, e por meio do uso de camundongos deficientes para o receptor Mas (Mas^{-/-}). Os resultados mostram que a injeção de LPS induziu um acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural que foi máximo no tempo de 12h, diminuindo em 48h. O bloqueio do receptor Mas por A779 reverteu a queda no número de neutrófilos que ocorre espontaneamente nesse modelo após 48h do desafio com LPS (Vago *et al.*, 2012; Vago *et al.*, 2016). De fato, estudo de Barroso e colaboradores (2017) mostrou que o antagonismo do receptor Mas com A779 reverteu o efeito pró-resolutivo da Ang-(1-7) administrada exogenamente. Assim, quando o peptídeo foi administrado durante o curso da inflamação no modelo de AIA, promovia a queda do número de neutrófilos e aumento da apoptose deste tipo celular, ambos os parâmetros marcadores de

resolução; e o bloqueio de MasR com A779 reverteu estes efeitos pró-resolutivos do peptídeo. Ainda de acordo com a participação de Mas na resolução da inflamação induzida por LPS, um estudo recente mostrou que a administração de Ang-(1-7) no pico da inflamação (tempo 8h) promoveu resolução da pleurisia induzida por LPS por meio da diminuição do número de neutrófilos recrutados para a cavidade (Santuchi *et al.*, 2019).

Embora o influxo de neutrófilos para a pleura após o desafio com LPS tenha sido igual em animais WT e Mas^{-/-}, mostramos aqui que animais Mas^{-/-} apresentaram menor número de células mononucleares no tempo de 48h, sugerindo que nesses animais há um comprometimento na migração dessas células e possivelmente em etapas de pós-resolução, ou, ainda, impactaria a resolução em um outro modelo inflamatório, dada a importância dos monócitos/macrófagos nessa etapa. De forma semelhante, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que animais deficientes para Plasminogênio e seu receptor de (PlgR), exibiram fenótipo parecido com o demonstrado aqui (Vago *et al.*, 2019).

De forma contrária, estudos anteriores utilizando modelos inflamatórios em animais Mas^{-/-} mostraram uma exacerbação da infamação nestes animais em relação aos animais WT. Por exemplo, o estudo de Souza e colaboradores (2015), mostrou altos níveis de IL-6, CXCL-1 e CXCL-2 em animais Mas^{-/-} após indução de endotoxemia por LPS. Esses animais também apresentaram menor resistência à endotoxemia, sendo sua taxa de sobrevivência de 50% comparada com 95% de camundongos do tipo selvagem (Souza *et al.*, 2014). De maneira similar, o estudo de Oliveira-Lima e colaboradores (2015) mostrou que animais Mas^{-/-} apresentaram exacerbação da inflamação sistêmica e cerebral induzida por LPS, caracterizada por aumento nos níveis plasmáticos de CXCL-1, CCL2 e IL-10 24h após o desafio com LPS. No cérebro, os animais Mas^{-/-} tiveram um aumento significativo no número de leucócitos aderentes à microvasculatura cerebral em comparação com os camundongos WT, bem como aumento do número de monócitos e neutrófilos recrutados para a pia-máter (Oliveira-Lima *et al.*, 2015).

Assim, a utilização de modelos inflamatórios mais crônicos poderá nos ajudar a desvendar a participação do eixo Ang-(1-7)/MasR no influxo de células

mononucleares, um evento importante para o processo de resolução (McArthur *et al.*, 2018).

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, por meio do presente estudo nós fornecemos evidências de que a Ang-(1-7) é um mediador de migração celular, por um mecanismo dependente de ativação dos receptores Mas e CCR e da via MEK/ERK1/2. Estudos adicionais serão necessários para complementação da ordem de acontecimento desses eventos e da importância da migração de monócitos/macrófagos induzida por Ang-(1-7) no processo de Resolução da inflamação.

8. PERSPECTIVAS

Ao finalizar esta dissertação, permanecem ainda alguns questões que necessitam ser melhor exploradas afim de que este trabalho possa ser finalizado e submetido posteriormente à publicação em uma revista de impacto científico. Destacam-se abaixo alguns experimentos que poderão ser realizados para atingirmos tal objetivo:

- Verificar se macrófagos de diferentes perfis respondem de maneira diferenciada frente ao estímulo quimiotático da Ang-(1-7). Aqui pretendemos pré-tratar os macrófagos com IFN/LPS (M1) e com IL-4 (M2) por 24h e posteriormente realizar os experimentos de quimiotaxia, com o intuito de verificar a capacidade migratória destes dois fenótipos.

- Estudar a participação da Ang-(1-7) em um modelo inflamatório em que o macrófago seja componente essencial para resolução, por exemplo, o modelo de ferida.

- Realizar experimentos utilizando AVE0991, um agonista sintético seletivo para o receptor Mas, como quimiotático para confirmar os dados obtidos com Ang-(1-7).

- Verificar se Ang-(1-7) possui efeito sinérgico com CCL2 em ensaios de quimiotaxia com células RAW 264.7.

- Verificar se o pré-tratamento com Ang-(1-7) modifica a capacidade migratória de macrófagos em direção a um agente flogístico, como, por exemplo, LPS ou fMLP.

- Avaliar se a deficiência em Mas (usando BMDMs de animais Mas^{-/-}) impacta a capacidade migratória de macrófagos em direção ao peptídeo Ang-(1-7), quando comparados aos BMDMs obtidos de animais WT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ariel, A., & Serhan, C. N. (2012). New lives given by cell death: Macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00004>
- Arthur, J. S. C., & Ley, S. C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3495>
- Bader, M., Alenina, N., Andrade-Navarro, M. A., & Santos, R. A. (2014). Mas and Its Related G Protein-Coupled Receptors, Mrgprs. *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008136>
- Bader, M., & Ganten, D. (2008). Update on tissue renin-angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0336-0>
- Barroso, L. C., Magalhaes, G. S., Galvão, I., Reis, A. C., Souza, D. G., Sousa, L. P., ... Teixeira, M. M. (2017). Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01596>
- Barroso, L. C., Silveira, K. D., Lima, C. X., Borges, V., Bader, M., Rachid, M., ... Teixeira, M. M. (2012). Renoprotective effects of AVE0991, a nonpeptide Mas receptor agonist, in experimental acute renal injury. *International Journal of Hypertension*. <https://doi.org/10.1155/2012/808726>
- Byrne, A., & Reen, D. J. (2002). Lipopolysaccharide Induces Rapid Production of IL-10 by Monocytes in the Presence of Apoptotic Neutrophils. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1968>
- Carey, R. M. (2005). Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: The AT2receptor comes of age. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000159192.93968.8f>
- Carey, R. M., & Siragy, H. M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0001>
- Carmo, A. A. F., Costa, B. R. C., Vago, J. P., de Oliveira, L. C., Tavares, L. P., Nogueira, C. R. C., ... Sousa, L. P. (2014). Plasmin Induces In Vivo Monocyte Recruitment through Protease-Activated Receptor-1-, MEK/ERK-, and CCR2-Mediated Signaling. *The Journal of Immunology*, 193(7), 3654–3663. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400334>
- Cerniello, F. M., Carretero, O. A., Carbajosa, N. A. L., Cerrato, B. D., Santos, R. A., Grecco, H. E., & Gironacci, M. M. (2017). MAS1 Receptor Trafficking Involves ERK1/2 Activation Through a β -Arrestin2-Dependent Pathway. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09789>
- Chen, C. S., Alonso, J. L., Ostuni, E., Whitesides, G. M., & Ingber, D. E. (2003). Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01165-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01165-3)
- Costa, M. A., Lopez Verrilli, M. A., Gomez, K. A., Nakagawa, P., Peña, C., Arranz, C., & Gironacci, M. M. (2010). Angiotensin-(1–7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in

spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00850.2009>

Da Silveira, K., Barroso, L. C., Vieira, A. T., Cisalpino, D., Lima, C. X., Bader, M., ... Teixeira, M. M. (2013). Beneficial Effects of the Activation of the Angiotensin-(1-7) Mas Receptor in a Murine Model of Adriamycin-Induced Nephropathy. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066082>

Dalli, J., & Serhan, C. N. (2017). Pro-resolving mediators in regulating and conferring macrophage function. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01400>

Daly, C., & Rollins, B. J. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: Therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation*. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800190>

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI11112>

Ferrario, C. M. (2006). Role of angiotensin II in cardiovascular disease - Therapeutic implications of more than a century of research. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. <https://doi.org/10.3317/jraas.2006.003>

Ferrario, C. M., Chappell, M. C., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B., & Diz, D. I. (1997). Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7). *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.30.3.535>

França, C. N., Izar, M. C. O., Hortêncio, M. N. S., do Amaral, J. B., Ferreira, C. E. S., Tuleta, I. D., & Fonseca, F. A. H. (2017). Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. *Clinical Science*. <https://doi.org/10.1042/CS20170009>

Freire-de-Lima, C. G., Yi, Q. X., Gardai, S. J., Bratton, D. L., Schiemann, W. P., & Henson, P. M. (2006). Apoptotic cells, through transforming growth factor- β , coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605146200>

Fullerton, J. N., & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39>

Galvão, I., Vago, J. P., Barroso, L. C., Tavares, L. P., Queiroz-Junior, C. M., Costa, V. V., ... Teixeira, M. M. (2017). Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. *European Journal of Immunology*, 47(3), 585–596. <https://doi.org/10.1002/eji.201646551>

Griendling, K. K., Murphy, T. J., & Alexander, R. W. (1993). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.87.6.1816>

Grobe, J. L. (2006). Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01170.2005>

Hammer, A., Yang, G., Friedrich, J., Kovacs, A., Lee, D.-H., Grave, K., ... Stegbauer, J. (2016). Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(49), 14109–14114.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1612668113>

Headland, S. E., & Norling, L. V. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>

Hickey, M. J., & Kubes, P. (2009). Intravascular immunity: The host-pathogen encounter in blood vessels. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2532>

Hochreiter-Hufford, A., & Ravichandran, K. S. (2013). Clearing the dead: Apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008748>

Huynh, M. L. N., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI0211638>

Iwata, M., Cowling, R. T., Yeo, S. J., & Greenberg, B. (2011). Targeting the ACE2-Ang-(1-7) pathway in cardiac fibroblasts to treat cardiac remodeling and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.12.003>

Junttila, M. R., Li, S.-P., & Westermarck, J. (2007). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7859rev>

KOLCH, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj3510289>

Kratofil, R. M., Kubes, P., & Deniset, J. F. (2017). Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308198>

Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., & Bravo, R. (1997). Defects in Macrophage Recruitment and Host Defense in Mice Lacking the CCR2 Chemokine Receptor. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.186.10.1757>

Kuziel, W., Morgan, S. J., Dawson, T. C., Griffin, S., Smithies, O., Ley, K., & Maeda, N. (1997). Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.12053>

Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., ... Santos, R. A. S. (2013). Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301077>

Lima, K. M., Vago, J. P., Caux, T. R., Negreiros-Lima, G. L., Sugimoto, M. A., Tavares, L. P., ... Sousa, L. P. (2017). The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on Annexin A1. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800391>

Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Teoh, H., Wang, G., Shukla, P. C., ... Verma, S. (2008). Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00331.2008>

Magalhaes, G. S., Barroso, L. C., Reis, A. C., Rodrigues-Machado, M. G., Gregório, J. F., Motta-Santos, D., ... Campagnole-Santos, M. J. (2018). Angiotensin-(1-7) promotes resolution of eosinophilic inflammation in an experimental model of asthma. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00058>

Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>

McArthur, S., Gobetti, T., Juban, G., Desgeorges, T., Theret, M., Gondin, J., ... Mounier, R. (2018). Annexin A1 drives macrophage skewing towards a resolving phenotype to accelerate the regeneration of muscle injury through AMPK activation. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/375709>

Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>

Mercure, C., Yogi, A., Callera, G. E., Aranha, A. B., Bader, M., Ferreira, A. J., ... Reudelhuber, T. L. (2008). Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184911>

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2448>

Naruse, K., Inagami, T., Celio, M. R., Workman, R. J., & Takii, Y. (1982). Immunohistochemical evidence that angiotensins I and II are formed by intracellular mechanism in juxtaglomerular cells. *Hypertension*. https://doi.org/10.1161/01.HYP.4.3_Pt_2.70

Nathan, C. (2008). Metchnikoff's legacy in 2008. In *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni0708-695>

Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>

Nguyen Dinh Cat, A., & Touyz, R. M. (2011). A new look at the renin-angiotensin system - Focusing on the vascular system. *Peptides*. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.09.010>

Oliveira-Lima, O. C., Pinto, M. C. X., Duchene, J., Qadri, F., Souza, L. L., Alenina, N., Carvalho-Tavares, J. (2015). Mas receptor deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced cerebral and systemic inflammation in mice. *Immunobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.07.013>

Perretti, M., Leroy, X., Bland, E. J., & Montero-Melendez, T. (2015). Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.007>

Perucci, L. O., Sugimoto, M. A., Gomes, K. B., Dusse, L. M., Teixeira, M. M., & Sousa, L. P. (2017). Annexin A1 and specialized proresolving lipid mediators: promoting resolution as a therapeutic strategy in human inflammatory diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1364363>

Petri, B., Phillipson, M., & Kubes, P. (2008). The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6439>

- Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3607>
- Prince, L. R., Whyte, M. K., Sabroe, I., & Parker, L. C. (2011). The role of TLRs in neutrophil activation. *Current Opinion in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.06.007>
- Rodrigues-Ferreira, S., & Nahmias, C. (2010). An ATIPical family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.009>
- Sampaio, W. O., De Castro, C. H., Santos, R. A. S., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (2007). Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.084848>
- Santiago, N. M., Guimarães, P. S., Sirvente, R. A., Oliveira, L. A. M., Irigoyen, M. C., Santos, R. A. S., & Campagnole-Santos, M. J. (2010). Lifetime overproduction of circulating angiotensin-(1-7) attenuates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension-induced cardiac dysfunction and remodeling. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.149815>
- Santos, R. A. S., e Silva, A. C. S., Maric, C., Silva, D. M. R., Machado, R. P., de Buhr, I., ... Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>
- Santuchi, M. D. C., Dutra, M. F., Vago, J. P., Lima, K. M., Galvão, I., Souza-neto, F. P. De, ... Fernandes, R. (n.d.). Angiotensin- (1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages In Vitro and In Vivo.
- Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601337>
- Sepe, L., Ferrari, M. C., Cantarella, C., Fioretti, F., & Paoletta, G. (2013). Ras activated ERK and PI3K pathways differentially affect directional movement of cultured fibroblasts. *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000343355>
- Serbina, N. V., & Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1309>
- Simon, S. I., & Green, C. E. (2005). Molecular Mechanics and Dynamics of Leukocyte Recruitment During Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100423>
- Skiba, D. S., Nosalski, R., Mikolajczyk, T. P., Siedlinski, M., Rios, F. J., Montezano, A. C., ... Guzik, T. J. (2017). Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1–7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 174(22), 4055–4069. <https://doi.org/10.1111/bph.13685>
- Sousa, L. P., Alessandri, A. L., Pinho, V., & Teixeira, M. M. (2013a). Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(4), 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.03.007>

- Sousa, L. P., Alessandri, A. L., Pinho, V., & Teixeira, M. M. (2013b). Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.03.007>
- Souza, L. L., & Costa-Neto, C. M. (2012). Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *Journal of Cellular Physiology*, 227(5), 2117–2122. <https://doi.org/10.1002/jcp.22940>
- Souza, L. L., Duchene, J., Todiras, M., Azevedo, L. C. P., Costa-Neto, C. M., Alenina, N., ... Bader, M. (2014). Receptor mas protects mice against hypothermia and mortality induced by endotoxemia. *Shock*. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000115>
- Stremmel, C., Schuchert, R., Wagner, F., Thaler, R., Weinberger, T., Pick, R., ... Schulz, C. (2018). Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02492-2>
- Sugimoto, M. A., Ribeiro, A. L. C., Costa, B. R. C., Vago, J. P., Lima, K. M., Carneiro, F. S., ... Sousa, L. P. (2017). Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-742825>
- Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2016). Resolution of inflammation: What controls its onset? *Frontiers in Immunology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160>
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>
- Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J. A. M., & Koenderman, L. (2013). What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.1112571>
- Teranishi, S., Kimura, K., & Nishida, T. (2009). Role of formation of an ERK-FAK-paxillin complex in migration of human corneal epithelial cells during wound closure in vitro. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2534>
- Vago, J. P., Nogueira, C. R. C., Tavares, L. P., Soriani, F. M., Lopes, F., Russo, R. C., ... Sousa, L. P. (2012). Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.0112008>
- Vago, J. P., Tavares, L. P., Sugimoto, M. A., Lima, G. L. N., Galvão, I., de Caux, T. R., ... Sousa, L. P. (2016). Proresolving Actions of Synthetic and Natural Protease Inhibitors Are Mediated by Annexin A1. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500886>
- Yamamoto, K., Chappell, M. C., Brosnihan, K. B., & Ferrario, C. M. (1992). In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.19.6.692>
- Yuan, S. Y., Shen, Q., Rigor, R. R., & Wu, M. H. (2012). Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvascular Research*. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2011.06.015>