

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**EFEITO DA ALAMANDINA NA INFLAMAÇÃO PULMONAR
ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS**

Juliana Fabiana Gregório

Belo Horizonte

2020

JULIANA FABIANA GREGÓRIO

**EFEITO DA ALAMANDINA NA INFLAMAÇÃO PULMONAR
ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Campagnole-Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Robson Augusto Souza Santos

Belo Horizonte
2020

043 Gregório, Juliana Fabiana.
Efeito da alamandina na inflamação pulmonar alérgica em camundongos
[manuscrito] / Juliana Fabiana Gregório. - 2020.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Campagnole-Santos. Coorientador: Prof.
Dr. Robson Augusto Souza dos Santos.

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

1. Asma. 2. Sistema Renina-Angiotensina. 3. Angiotensinas. 4. Eosinófilos. I.
Campagnole-Santos, Maria José. II. Santos, Robson Augusto Souza dos. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.
Título.

CDU: 612

“Quando as raízes são profundas, não há razão para temer o vento”



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

"EFEITO DA ALAMANDINA NA INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS"

JULIANA FABIANA GREGÓRIO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 04 de setembro de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. CELSO RICARDO FERNANDES DE CARVALHO, FM/USP
PROFA. DRA. ANDREIA TEIXEIRA DE CARVALHO, IRR/FIOCRUZ MINAS
PROFA. DRA. VANESSA PINHO DA SILVA, ICB/UFMG
PROF. DR. ANDRÉ KLEIN, ICB/UFMG
PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS, ICB/UFMG - COORIENTADOR
PROFA. DRA. MARIA JOSÉ CAMPAGNOLE SANTOS, ICB/UFMG - ORIENTADORA

Belo Horizonte, 24 de agosto de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Pinho da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 04/09/2020, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Campagnole dos Santos, Subcoordenador(a)**, em 04/09/2020, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celso RF Carvalho, Usuário Externo**, em 05/09/2020, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Klein, Professor do Magistério Superior**, em 07/09/2020, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson Augusto Souza dos Santos, Servidor aposentado**, em 08/09/2020, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Teixeira de Carvalho, Usuário Externo**, em 08/09/2020, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0227003** e o código CRC **3C66B141**.

Dedico esse trabalho à minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido concluir essa importante etapa da minha vida. Por sua misericórdia, cuidado e proteção.

A minha família, pelo apoio, compressão e por sempre estar ao meu lado me incentivando nas minhas conquistas. Muito obrigada por tudo.

A minha orientadora, Professora Maria José Campagnole-Santos, pela oportunidade de realizar meu doutorado no laboratório de Hipertensão, por todos seus ensinamentos que contribuíram para a minha formação acadêmica e meu crescimento profissional. Por sua dedicação, incentivo e compreensão lhe serei eternamente grata.

Ao professor Robson Augusto Souza dos Santos meu Co-orientador, por sua contribuição na realização desse trabalho. Acima de tudo por ser um exemplo de cientista e por contribuir de maneira tão efetiva para a compreensão da complexidade do sistema renina angiotensina. Sou muito grata pela oportunidade de convivência e por todo crescimento profissional.

A professora Maria da Glória Rodrigues Machado por sua disponibilidade, seu incentivo, sua amizade e por sua generosidade. Muito obrigada.

A minha amiga Giselle Santos Magalhães, por ter me ajudado na realização dos experimentos. Por sempre me apoiar nos momentos difíceis e me ajudar a superar as adversidades. Muito obrigada por sua amizade sincera.

A professora Vanessa Pinho e Lucíola Barcelos por colaborarem conosco na realização dos experimentos. Muito obrigada.

Aos professores e aos colegas do laboratório de Hipertensão.

Ao CNPq, FAPEMIG E CAPES pelo financiamento concedido

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Hipertensão, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Asma.....	19
1.2 Sistema renina-angiotensina e Asma	30
1.3 Alamandina e o receptor MrgD.....	36
1.4 Justificativa	43
2. OBJETIVO GERAL E ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	45
2.1 Objetivo geral.....	45
2.2. Estratégias experimentais.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 Animais	47
3.2 Imunização e desafio com ovalbumina	47
3.3 Tratamento com Alamandina	48
3.4 Lavado broncoalveolar (LBA) e coleta dos tecidos	50
3.5 Determinação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) e Peroxidase Eosinofílica (EPO)	50
3.6 Técnica para dosagem da atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG)	51
3.7 Imunofluorescência	52
3.8 Análise histológica	52
3.9 Análise ELISA	53
3.10 Proteína medida por Western blotting.....	53
3.11 Análise estatística.....	54
4. RESULTADOS.....	56
4.1 Receptor MrgD está presente em leucócitos	56
4.2 Tratamento com Alamandina previne o acúmulo de eosinófilos no pulmão	58
4.3 Alamandina atenua o aumento de citocinas e quimiocinas no pulmão	59
4.4 Alamandina previne o aumento da expressão de GATA3 e I κ B- α no tecido pulmonar	61
4.5 Alamandina atenua o acúmulo celular no pulmão	63
4.6 Alamandina atenua a deposição de matriz extracelular nas vias aéreas.....	64
4.7 Presença de eosinófilos no fluido do LBA de animais MrgD-KO submetidos a modelo de asma alérgica	66

4.8 Infiltração de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no pulmão dos animais MrgD-KO submetidos a modelo de asma alérgica	68
4.9 Avaliação do acúmulo de células inflamatórias em diferentes regiões do pulmão em camundongos MrgD-KO submetidos ao modelo de asma alérgica	71
4.10 Avaliação do remodelamento das vias aéreas de camundongos MrgD-KO submetidos ao modelo de asma alérgica	72
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE ABREVIATURAS

A779	Antagonista seletivo do receptor Mas
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
AT1	Receptor tipo 1 da angiotensina II
AT2	Receptor tipo 2 da angiotensina II
AVE 0991	Agonista não peptídico do receptor Mas
CCR3 R	Receptor de quimiocina C-C tipo 3
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina do tipo 2
ERK ½	Extracellular signalregulated kinase ½
FCεR1	Receptor de alta afinidade para IgE
GATA3	Proteína 3 de ligação ao GATA
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HPβCD	Hidroxipropil β-ciclodextrina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
LBA	Lavado broncoaveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MMP-9	Metaloproteinase 9
MPO	Mieloperoxidase
MrgD	Membro D do receptor acoplado à proteína G da família Mas
MrgD-KO	Animal geneticamente deficiente para o receptor MrgD
NAFT	Fator nuclear ativado de células T
NFKB	Fator nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
OVA	Ovulmina
PA	Pressão Arterial

PKA	Proteína kinase A
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SRA	Sistema renina angiotensina
STAT-6	<i>“Signal transducer and activator of transcription”</i>
T-BET	<i>T-box binding transcription fator</i>
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator transformador de crescimento do tipo beta
Th2	Linfócitos T helper 2
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da asma.	22
Figura 2. Representação esquemática do recrutamento de eosinófilos para o pulmão.	24
Figura 3. Esquema simplificado da ativação do fator de transcrição GATA3.....	26
Figura 4. Visão atualizada e simplificada da cascata de formação dos peptídeos do sistema renina-angiotensina.....	31
Figura 5. Efeitos da Alamandina em diferentes células e tecidos.....	40
Figura 6. Protocolo experimental em camundongos Balb/c.....	49
Figura 7. Protocolo experimental em Camundongos MrgD-KO.....	49
Figura 8. Marcação do receptor MrgD em leucócitos.....	56
Figura 9. Controle negativo da imunofluorescência.....	57
Figura 10. Leucócitos no fluido do lavado broncoalveolar.....	58
Figura 11. Nível de citocinas e quimiocinas no pulmão.	60
Figura 12. Expressão de GATA3 e I κ B- α no pulmão.....	62
Figura 13. Escore da infiltração de células no pulmão.	63
Figura 14. Deposição de matriz extracelular no pulmão.....	64
Figura 15. Deposição total de colágeno nos pulmões.....	65
Figura 16. Quantificação de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de camundongos com deleção genética do receptor MrgD.....	67
Figura 17. Atividade enzimática nos pulmões de animais com deleção genética do receptor MrgD.	69
Figura 18. Espessamento da parede alveolar de animais com deleção genética do receptor MrgD.	70
Figura 19. Escore histológico de células inflamatórias infiltradas em diferentes áreas do pulmão.	71
Figura 20. Deposição de colágeno nas vias aéreas de animais com deleção genética do receptor MrgD. Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão.	72

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por uma síndrome clínica de hiperresponsividade brônquica, inflamação e obstrução reversível ao fluxo aéreo. O sistema renina-angiotensina (SRA) está envolvido na fisiopatologia da inflamação pulmonar, sendo a angiotensina II (Ang II) um fator pró-inflamatório e a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] anti-inflamatório. Alamandina é um novo peptídeo do SRA que pode ser formado a partir de Ang A, através da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) ou diretamente da Ang-(1-7) através da descarboxilação do resíduo amino terminal, o ácido aspártico. Atualmente, a maioria das ações atribuídas a Alamandina estão relacionadas ao sistema cardiovascular. Estudos prévios mostraram que Alamandina induz efeitos cardioprotetores como liberação de óxido nítrico, efeitos anti-fibróticos e anti-hipertrofos. No presente estudo, investigamos o efeito da Alamandina em um modelo experimental de asma induzido por ovalbumina (OVA). Para este propósito, camundongos BALB/c foram submetidos a inflamação pulmonar alérgica, por sensibilização (duas injeções de 100 µg de OVA com adjuvante de hidróxido de alumínio a 2%, intervalo de 7 dias) e desafio com ovalbumina (OVA) (8 administrações intranasais de 10 µg de OVA, 12-19º dia). Camundongos sensibilizados e desafiados com OVA foram tratados com administração oral de Alamandina (50 µg/ kg) incluída em HPβCD antes de cada desafio. No 21º dia do protocolo (48 horas após o último desafio com OVA) foi coletado o fluido do lavado broncoalveolar (LBA) e os pulmões. A expressão proteica de GATA3 e IκB-α foi realizada por Western blotting, citocinas e quimiocinas por ELISA e o remodelamento pulmonar foi avaliado por histologia. Primeiramente, utilizando a técnica de imunofluorescência mostramos que o receptor envolvido nos efeitos da Alamandina, o MrgD, está expresso em macrófagos, eosinófilos e neutrófilos provenientes do fluido do LBA. Camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com formulação oral de Alamandina, apresentaram redução do número de eosinófilos no LBA. A redução da inflamação pulmonar foi associada à menor

ativação de GATA3 e NF- κ B. Além disso, a Alamandina reduziu a deposição de matriz extracelular e colágeno entorno das vias aéreas. Para avaliar a participação do receptor MrgD na inflamação pulmonar alérgica, utilizamos animais com deficiência genética do receptor MrgD (MrgD-KO). Camundongos MrgD-KO desafiados com OVA apresentaram perfil inflamatório semelhante aos animais WT-OVA (C57Bl6/J). O número de eosinófilos no fluido do LBA não foi diferente dos encontrados nos camundongos WT-OVA. No entanto, observamos menor atividade das enzimas peroxidase eosinofílica e mieloperoxidase no pulmão do grupo MrgD-KO-OVA, que indica redução de eosinófilos e neutrófilos no tecido. Também observamos atenuação do espessamento da parede alveolar nos MrgD-KO. Em conjunto os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com formulação oral de Alamandina induz efeitos antiinflamatórios e antifibróticos no pulmão de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Na ausência do receptor MrgD, no entanto, os camundongos apresentaram perfil inflamatório semelhante ao observado nos animais WT, sugerindo que outros mecanismos compensam a falta de atuação da Alamandina/MrgD e o curso da inflamação pulmonar não se altera. Os resultados deste estudo ampliam o conjunto de ações do SRA e indicam que a Alamandina pertence ao grupo de peptídeos contrarreguladores deste sistema e que, o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que levem ao aumento de Alamandina poderão contribuir para melhorar o tratamento das doenças inflamatórias.

Palavras chave: Alamandina, receptor MrgD, eosinófilos, GATA3, Sistema renina-angiotensina

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by a clinical syndrome of bronchial hyperresponsiveness, inflammation and reversible airflow obstruction. The renin-angiotensin system (RAS) is involved in the pathophysiology of pulmonary inflammation, with angiotensin II (Ang II) being a pro-inflammatory and angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] anti-inflammatory. Alamandine is a new RAS peptide formed from Ang A, through angiotensin converting enzyme 2(ACE2) or, directly from Ang-(1-7) through the decarboxylation of the amino terminal residue, aspartic acid. Currently, most of the actions attributed to Alamandine are related to the cardiovascular system. Previous studies have shown that Alamandine induces cardioprotective effects, such as, release of nitric oxide, anti-fibrotic and anti-hypertrophic effects. In the present study, we investigated the effect of Alamandine in an experimental model of asthma induced by ovalbumin (OVA). For this, BALB/c mice were subjected to allergic pulmonary inflammation by OVA sensitization (2 injections of 100 µg of OVA with 2% aluminum hydroxide adjuvant, 7 days apart) and challenge (8 administrations of 10 µg OVA, from 12nd to 19th day of protocol). Mice sensitized and challenged with OVA were treated with oral administration of Alamandine (50 µg/kg) included in HPβCD before each challenge. On the 21st day of the protocol (48 hours after the last challenge with OVA), bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and lungs were collected. Protein expression of GATA3 and IκB-α was performed by Western blotting, cytokines and chemokines by ELISA and pulmonary remodeling was assessed by histology. First, using the immunofluorescence technique, we showed that the receptor involved in the effects of Alamandine, MrgD, is expressed in macrophages, eosinophils and neutrophils in the BAL fluid. Mice sensitized and challenged with OVA and treated with oral formulation of Alamandine showed a reduction in the number of eosinophils in BALF. Reduction in pulmonary inflammation was associated with lower activation of GATA3 and NF-κB. In addition, Alamandine reduced the deposition of extracellular matrix

and collagen around the airways. To evaluate the participation of the MrgD receptor in allergic lung inflammation, we used animals with genetic deficiency of the MrgD receptor (MrgD-KO). MrgD-KO mice challenged with OVA showed an inflammatory profile similar to the animals WT-OVA (C57Bl6/J). The number of eosinophils in the BAL fluid was not different from those found in WT-OVA mice. However, we observed lower activity of the eosinophilic peroxidase and myeloperoxidase enzymes in the lung of the MrgD-KO-OVA group, which indicates a reduction in eosinophils and neutrophils in the tissue. We also observed attenuation of the thickening of the alveolar wall in MrgD-KO. Together the results of this study showed that treatment with oral formulation of Alamandine induces anti-inflammatory and antifibrotic effects in the lung of mice sensitized and challenged with OVA. In the absence of the MrgD receptor, however, the mice presented inflammatory profile similar to that observed in WT animals, suggesting that other mechanisms compensate the lack of Alamandine MrgD action. The results of this study advance the of actions of the RAS and indicate that Alamandine belongs to the group of counter-regulatory peptides of this system. Further, the development of pharmacological strategies that lead to an increase in Alamandine may contribute to improving treatment of inflammatory diseases.

Key words: Alamandine, MrgD receptor, eosinophils, GATA3, Renin-angiotensin system

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada pelo recrutamento e migração de células inflamatórias para os pulmões (Holgate et al., 2015). A asma é a doença inflamatória mais comum do sistema respiratório, acometendo tanto crianças quanto adultos. Recentes estudos epidemiológicos estimam que a asma afeta cerca de 334 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da asma, altas taxas de morbidade e mortalidade ainda estão associadas a essa doença pulmonar (Papi, Brightling, Pedersen, & Reddel, 2018).

As manifestações clínicas da asma são dispneia, sibilos, tosse, excesso de produção de muco e limitação variável ao fluxo aéreo. A patogênese da asma está fortemente relacionada a interações genéticas, ambientais e sequência de eventos inflamatórios e de reparo tecidual, tais condições impossibilitam a prevenção e a cura. Sendo assim, é essencial o controle adequado da inflamação pulmonar, a fim de evitar exacerbações dos sintomas, hospitalizações e morbidade, contribuindo para a melhora da qualidade de vida e manutenção das atividades de vida diária do paciente asmático (Global Initiative for Asthma, 2020; Russell & Brightling, 2017).

Tradicionalmente na clínica médica dois fenótipos de asma estão bem caracterizados. A asma alérgica e asma não alérgica. A maioria das crianças e aproximadamente 50% dos adultos apresentam o fenótipo de asma alérgica, caracterizado por níveis séricos elevados de imunoglobulina E (IgE) (Lambrecht & Hammad, 2015). Geralmente a asma alérgica tem início na infância e se perpetua até a idade adulta. A existência de outras desordens alérgicas como

eczema e rinite alérgica é frequentemente observada nesses pacientes, aproximadamente 80% dos indivíduos asmáticos apresentam rinite alérgica e asma na fase adulta.

Por outro lado, a asma não alérgica geralmente se inicia na fase adulta e não está associada a níveis elevados de IgE no plasma. O fenótipo de asma não alérgica é mais comum em mulheres e está frequentemente associado a rinosinusite crônica, pólipos nasais e obesidade (de Groot, Ten Brinke, & Bel, 2015; Lambrecht & Hammad, 2015).

A sensibilização ao alérgeno é a etapa inicial para que o indivíduo desenvolva a asma. Esse processo leva à expansão clonal de células CD4⁺ T helper 2 (Th2), para que ocorra a defesa efetiva do hospedeiro (representado na figura 1). Linfócitos Th2 são responsáveis por orquestrar a resposta imune na asma, por meio da liberação das interleucinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (Holgate, 2011; Holgate & Polosa, 2008; Pelaia, Vatrella, & Maselli, 2012; Wynn, 2015).

Indivíduos atópicos geralmente são sensibilizados a alérgenos ambientais comuns, como ácaro de poeira, pelos de animais domésticos e pólen de flores. Após ser inalado o alérgeno se direciona para as vias aéreas, onde é capturado e processado pelas células dendríticas residentes no epitélio respiratório. As células dendríticas migram para linfonodos regionais e através do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) apresentam os peptídeos provenientes do processamento do alérgeno para as células T *naive*. Na presença de IL-4 células T *naive* se diferenciam em linfócitos Th2. Este tipo celular passa a sintetizar e liberar importantes citocinas como a IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 que são responsáveis pela ativação de células inflamatórias e pela produção de IgE. As citocinas IL-4 e IL-13 estimulam a célula B a realizar a troca de classe de anticorpo, de imunoglobulina G para IgE (Tavakkol Afshari et al., 2007). A IgE uma vez liberada se liga aos receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI) presentes na membrana de mastócitos e basófilos residentes no tecido, sensibilizando essas células para responderem imediatamente após uma segunda exposição ao

mesmo alérgeno (Galli, Tsai, & Piliponsky, 2008; Holgate et al., 2015; Paul & Zhu, 2010; Pelaia et al., 2012).

A formação do complexo alérgeno+FcεRI+IgE induz a degranulação de mastócitos e basófilos, dando início a liberação de potentes mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas que são liberadas no tecido pulmonar. Esse processo pode ser classificado como fase inicial da inflamação ou reação de hipersensibilidade imediata, pois ocorre logo após a segunda exposição ao alérgeno e possui duração de aproximadamente 1-30 minutos. Clinicamente essa fase reflete um período de broncoconstrição induzida por mediadores inflamatórios liberados por mastócitos. A fase tardia tem início 6-72 horas após a exposição ao alérgeno. A principal característica dessa fase é um grande influxo de leucócitos, principalmente eosinófilos para os pulmões. Clinicamente observa-se intensificação da hiperresponsividade das vias aéreas (Galli et al., 2008; Kudo, Ishigatsubo, & Aoki, 2013).

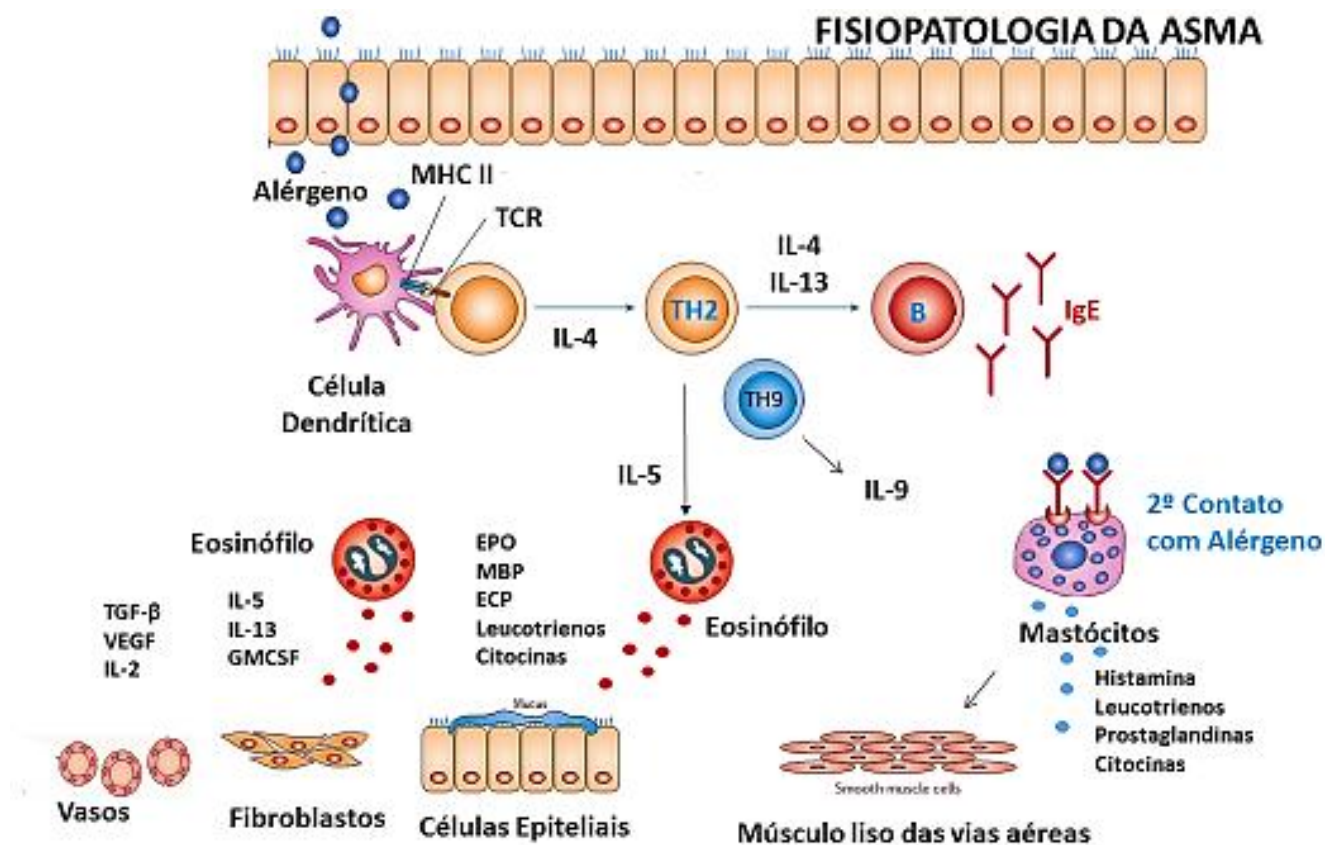


Figura 1. Fisiopatologia da asma.

Esquema simplificado da fisiopatologia da asma. No lúmen das vias aéreas, o alérgeno é capturado por células dendríticas, que processam as moléculas antigênicas e as apresentam ao linfócito T auxiliar Naive (TH0). A diferenciação dos linfócitos T em Th2 induz a produção de IL-4 e IL-13, que estimulam a célula B a produzir o anticorpo imunoglobulina E (IgE). As células Th2 também liberam IL-5, o que induz a diferenciação, maturação e sobrevivência de eosinófilos. Além das células Th2, as células Th9 que liberam IL-9 se tornam ativadas, levando ao crescimento e recrutamento de mastócitos, que após degranulação dependente de IgE, liberam mediadores pré-formados e recém sintetizados. Diversos mediadores inflamatórios, produzidos por leucócitos que migraram para os pulmões contribuem para a inflamação pulmonar crônica. Essa condição inflamatória induz a proliferação de células estruturais das vias aéreas, incluindo células epiteliais, fibroblastos, células do músculo liso e células vasculares endoteliais. Modificado de Pelaia e cols. (2012).

Durante o processo de inflamação das vias aéreas, histamina e leucotrienos liberados por mastócitos são capazes de ativar o endotélio vascular com a finalidade de permitir o tráfico de leucócitos para os pulmões. O rolamento, adesão e migração de eosinófilos é facilitado pelo aumento da expressão endotelial de P-selectina e E-selectina, seguido pelo aumento de moléculas de adesão celular, como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular -1 (VCAM-1), que vão interagir com os receptores de integrinas no intuito de facilitar sua passagem para o espaço perivascular (Bentley et al., 1993; Gonzalo et al., 1998; Håkansson, Björnsson, Janson, & Schmekel, 1995).

Na asma alérgica, os eosinófilos são as principais células hematopoiéticas recrutadas para as vias aéreas e desempenham um papel crucial na inflamação e no remodelamento pulmonar. O fato dos eosinófilos serem seletivamente atraídos para os pulmões durante a inflamação pulmonar alérgica sugere que um quimioatraente específico para eosinófilos poderia estar sendo liberado durante a resposta inflamatória alérgica. Nesse sentido um papel importante na quimiotaxia de eosinófilos foi atribuído a eotaxina-1 (Jose et al., 1994). Eotaxina-1 é um potente e seletivo quimioatraente capaz de induzir uma liberação rápida de eosinófilos e de seus progenitores da medula óssea (Palframan, Collins, Williams, & Rankin, 1998). Além disso, essa quimiocina contribui para que estas células sejam ativadas e seus grânulos tóxicos sejam liberados (Kampen et al., 2000). Eotaxina-1 sinaliza via receptor de quimiocina C-C tipo 3 (CCR3), este receptor é amplamente expresso em eosinófilos (Williams, 2015). Durante a inflamação pulmonar alérgica as células estruturais das vias aéreas como músculo liso, macrófagos alveolares e células epiteliais liberam eotaxina-1, formando um gradiente quimiotático permanente para os eosinófilos no tecido pulmonar (Williams, 2015).

Estudos clínicos mostram que o aumento de eosinófilos na corrente sanguínea e sua permanência nos pulmões está associado à gravidade da asma e à perda da função pulmonar (Bousquet et al., 1990; Carlson et al., 1992; Ortega et al., 2018; Robinson et al., 1992). No

tecido inflamado, os eosinófilos ativados liberam suas proteínas granulares: proteína básica principal (MBP), peroxidase eosinofílica (EPO), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), que amplificam e prolongam a resposta inflamatória levando ao dano tecidual (Bousquet et al., 1990; Kay, 2005).

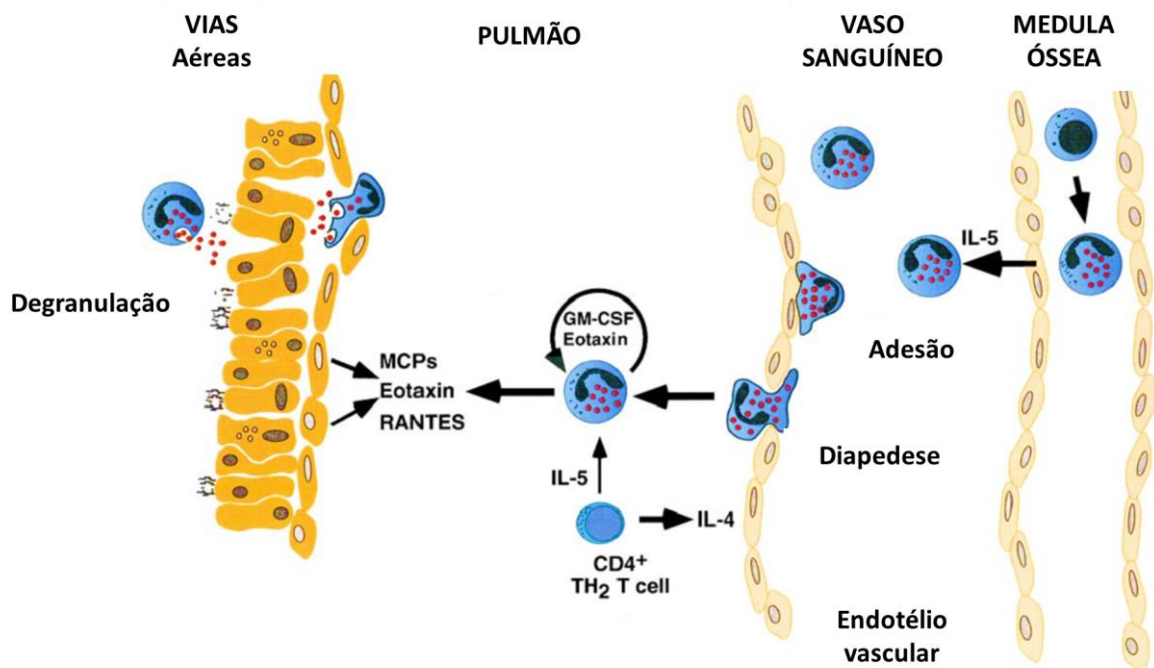


Figura 2. Representação esquemática do recrutamento de eosinófilos para o pulmão.

Na medula óssea células progenitoras hematopoiéticas sob o estímulo de IL-5 se diferenciam em eosinófilos maduros. Os eosinófilos circulantes interagem posteriormente com o endotélio, por processos que envolvem rolagem, adesão e migração. Essas etapas são reguladas por fatores quimiotáticos de eosinófilos e pela regulação positiva de moléculas de adesão endotelial. Obedecendo a um gradiente quimiotático estabelecido por eotaxina, MCPs e RANTES, eosinófilos migram para os pulmões. Além disso, os eosinófilos têm a capacidade de gerar seu próprio quimioatraente autócrino (eotaxina-1) e fatores de sobrevivência (GM-CSF). Dependendo do gradiente de concentração da quimiocina, os eosinófilos também transmigram pelo epitélio respiratório e têm o potencial de degranular, resultando em dano epitelial. Modificado de Rothenberg, 1999.

A imunidade do tipo 2 é regulada principalmente pelo fator de transcrição proteína 3 de ligação ao (GATA3). GATA3 é considerado o regulador mestre envolvido na diferenciação das células Th2. O GATA3 é um dos integrantes da família GATA constituída de seis diferentes fatores de transcrição. Os componentes dessa família são expressos em diferentes tipos celulares e tecidos. GATA 1, 2 e 3 se encontram expressos principalmente em células T, células dendríticas, eritrócitos, plaquetas, mastócitos e eosinófilos. Enquanto GATA 4, 5 e 6 são expressos no tecido cardíaco, tecido pulmonar e no intestino. O GATA3 se liga a sequência de DNA GATA ativando a região promotora de genes responsáveis pela síntese de citocinas Th2 (Garn & Renz, 2017). O mecanismo que envolve a ativação do receptor de células T (TCR) e o receptor de IL-4 foi proposto para induzir a ativação de GATA3 mediando a diferenciação de células Th2 (figura 3). A estimulação do TCR ativa o fator nuclear ativado de células T (NAFT), enquanto a sinalização induzida pelo receptor de IL-4 ativa o transdutor de sinal ativado de transcrição 6 (STAT 6). Em conjunto NFAT e STAT 6 induzem a transcrição de GATA3 (Bégin & Nadeau, 2014). Além disso, ao ser ativado GATA3 inibe a codificação do principal fator de transcrição de células Th1 o *T-box binding transcription factor* (T-bet), inibindo a diferenciação de células Th1 e favorecendo Th2. Zhu e cols. (2004), mostraram que a exclusão genética de GATA3 limita o desenvolvimento de células Th2 mas não limita o desenvolvimento de células Th1 (Zhu et al., 2004).

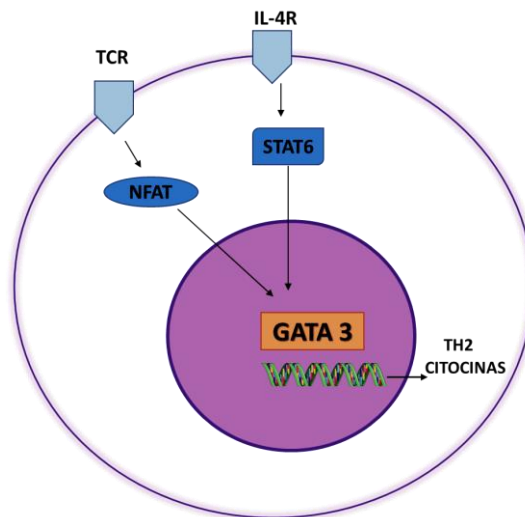


Figura 3. Esquema simplificado da ativação do fator de transcrição GATA3

GATA3 pode ser ativado pelo receptor de células T (TCR) via fator nuclear ativado de células T (NFAT) e também pode ser ativado via receptor de IL-4 por meio da fosforilação da transdutor de sinal ativado de transcrição 6 (STAT-6). A seguir GATA3 se direciona para o núcleo onde se liga a região promotora do DNA afim de induzir um resposta imune Th2.

Evidências clínicas mostraram que GATA3 está amplamente expresso em células do fluido do lavado broncroalveolar (LBA) e em amostras de biopsia brônquicas de pacientes asmáticos. Nesses pacientes o número de células expressando GATA3 correlacionou-se positivamente com a redução do calibre das vias aéreas e a presença de hiperresponsividade brônquica (Nakamura et al., 1999). Em outro estudo clínico mostrou-se que a expressão de GATA3 aumenta rapidamente no pulmão de pacientes asmáticos logo após desafio com alérgeno, o que sugere que o contato com alérgeno leva a uma rápida diferenciação de células Th2 nos pulmões de indivíduos asmáticos (Erpenbeck et al., 2006).

A asma é uma doença complexa e heterogênea, na qual múltiplos mediadores inflamatórios estão envolvidos e contribuem para as alterações patológicas das vias aéreas. Nesse sentido, outro importante fator de transcrição envolvido na patogênese da asma é o fator nuclear (NF) -kappaB (NF-kB). A inflamação pulmonar alérgica induz ativação de NF-kB que por sua vez regula a expressão de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e a sobrevivência de

leucócitos (Schuliga, 2015). A atividade do NF- κ B é controlada por seu inibidor I κ B- α responsável por manter o complexo NF- κ B no citoplasma, impedindo sua translocação para o núcleo (Christian, Smith, & Carmody, 2016; Schuliga, 2015). Após a estimulação celular em resposta a citocinas inflamatórias, stress oxidativo, infecção, produtos microbianos e alérgicos, dentre outros, o I κ B- α é fosforilado, e expõe a sequência de localização nuclear do NF- κ B, permitindo a sua entrada no núcleo, com conseqüente ligação ao DNA e transcrição de genes regulados por NF- κ B (Christman, Sadikot, & Blackwell, 2000). A diversidade de mediadores inflamatórios sintetizados via ativação de NF- κ B, fazem desse fator de transcrição um alvo terapêutico interessante para o tratamento da asma (Holgate & Polosa, 2008).

A relevância do NF- κ B no desenvolvimento da fisiopatologia da asma foi mostrada através da utilização de camundongos com deficiência da subunidade p50 do NF- κ B. Esses animais quando desafiados com ovalbumina (OVA) foram incapazes de liberar IL-5 e eotaxina-1, que são necessários para diferenciação, maturação e recrutamento de eosinófilos para o tecido pulmonar. Amplo acúmulo de eosinófilos foi observado nos animais WT diferindo do que foi observado nos pulmões dos animais que apresentavam NF- κ B ineficiente (Yang et al., 1998).

As diretrizes internacionais para o tratamento da asma, preconizam como tratamento padrão, a utilização de corticosteroides inalatórios e agonista β 2 adrenérgico de curta e longa duração. Os corticosteroides inalatórios reduzem a inflamação das vias aéreas e diminuem os riscos de exacerbações. Complementar a corticoterapia, o agonista β 2 adrenérgico é considerado medicação de alívio, sendo administrado em pacientes que apresentam piora dos sintomas, exacerbações e também pode ser utilizado para prevenir a broncoconstrição induzida pelo exercício físico (Global Initiative for Asthma, 2020).

O avanço no entendimento dos mecanismos celulares subjacentes a fisiopatologia da asma permitiu a possibilidade de novas abordagens terapêuticas. Sobretudo na utilização de imunobiológicos para broquear a resposta inflamatória em diferentes níveis (Dantzer & Wood,

2018; Licari, Marseglia, Castagnoli, Marseglia, & Ciprandi, 2015). Por exemplo, o anticorpo monoclonal anti-IgE (Omalizumab) foi desenvolvido como uma alternativa de tratamento para os pacientes que não respondem adequadamente aos corticosteroides inalados e para evitar a utilização de corticosteroides orais (Humbert et al., 2018; Pelaia et al., 2018). O medicamento Omalizumab neutraliza os níveis de IgE impedindo que esse anticorpo se ligue ao seu receptor, resultando em uma menor magnitude da inflamação das vias aéreas e maior controle dos sintomas (Humbert et al., 2018). Resultados semelhantes também foram observados com outros anticorpos monoclonais que afetam a inflamação Th2, sugerindo a existência de uma ou mais vias de alimentação da fisiopatologia da asma. No entanto, apesar desses resultados promissores com os imunobiológicos, não foi comprovado se essas terapias mudam o curso da fisiopatologia da asma a longo prazo. Além disso, é necessária uma análise farmacoeconômica para utilização dessas terapias (Kupryś-Lipińska, Molińska, & Kuna, 2016; McGregor et al., 2019).

Na asma a falha na resolução do processo inflamatório causa uma inflamação persistente com conseqüente destruição do tecido e perda da função pulmonar (Muñoz, Berens, Lauber, Gaipl, & Herrmann, 2015). Assim, a migração e manutenção de eosinófilos nos pulmões se correlaciona positivamente com o dano pulmonar, hiperresponsividade brônquica e remodelamento das vias aéreas (Muñoz et al., 2015). Além disso, células estruturais das vias aéreas como epitélio respiratório e células musculares lisas também modulam a inflamação pulmonar. Essas células secretam inúmeros mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Lin et al., 2014; Wong et al., 2006). Portanto, o desequilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios e entre a síntese e degradação da matriz extracelular leva ao remodelamento das vias aéreas, que tem sido correlacionado com a maioria dos sintomas, gravidade e progressão da asma (Lin et al., 2014). Nesse contexto, a manutenção da inflamação altera a homeostase pulmonar e culmina em manifestações clínicas que afetam a

qualidade de vida do paciente asmático (Holgate, 2011). O remodelamento das vias aéreas é caracterizada pela perda da integridade epitelial e desnudação da membrana basal, fibrose subepitelial, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas, hiperplasia e hipertrofia das glândulas submucosas com aumento produção de muco, obstrução e espessamento das paredes das vias aéreas e perda da integridade da cartilagem (Bergeron, Tulic, & Hamid, 2010). Além disso, a inflamação e a remodelação pulmonar em pacientes asmáticos e em modelos experimentais de asma não se restringem às vias aéreas e se estendem ao parênquima e aos vasos pulmonares (Xisto et al., 2005). Em paralelo com as alterações estruturais pulmonares, a hiperresponsividade das vias aéreas é um fenômeno importante na manifestação clínica do paciente asmático. A hiperresponsividade das vias aéreas envolve vários fatores, tais como, arquitetura das vias aéreas, inflamação e remodelamento brônquico (Xisto et al., 2005). Nesse sentido, um estudo experimental mostrou que a hiperresponsividade das vias aéreas era dependente de citocinas Th2 (Komai et al., 2003). Portanto, a hiperresponsividade das vias aéreas está diretamente relacionada a ativação da resposta Th2 no pulmão.

1.2 Sistema renina-angiotensina e Asma

O sistema renina-angiotensina (SRA) é considerado um dos mais importantes sistemas reguladores da homeostase cardiovascular e hidroeletrólítica. A sua influência sobre as funções cardiovasculares e renais é extremamente ampla e complexa, pois envolve múltiplos mediadores, receptores e diversos mecanismos de sinalização intracelular (Santos et al., 2018).

Classicamente o SRA era considerado como uma via hormonal circulante, onde o substrato liberado pelo fígado, o angiotensinogênio, uma α -glicoproteína é hidrolisada na circulação pela aspartil protease renina, secretada pelas células justaglomerulares dos rins, formando assim o decapeptídeo Angiotensina I (Ang I). Por sua vez, a enzima conversora de angiotensina (ECA), se encontra predominante na circulação pulmonar, remove dois aminoácidos C-terminais (His-Leu) da Ang I formando o octapeptídeo Ang II, considerado o principal peptídeo ativo do SRA (Paul, Poyan Mehr, & Kreutz, 2006). No entanto, atualmente sabe-se que outros peptídeos podem ser formados no SRA, incluindo a Ang-(2-8) Ang III, Ang-(3-8) Ang IV, Ang-(1-7), Ang-(1-12), Ang-(1-9) e a Alamandina. A cascata de formação do SRA e as principais enzimas e receptores envolvidos estão apresentados na Figura 4.

Estudos realizados nas três últimas décadas mostraram que além do eixo clássico, formado por (ECA)/ Angiotensina II (Ang II)/ receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1), outros eixos são mediadores finais desse sistema. Dentre eles o eixo formado pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2)/ angiotensina- (1-7) [Ang-(1-7)]/ Receptor Mas foi identificado e caracterizado (Santos, 2014; Santos et al., 2003). Evidências acumuladas mostram que o equilíbrio entre a ativação o eixo ECA/AngII/AT1 e ECA2/Ang-(1-7)/Mas desempenha um importante papel na manutenção da homeostase de vários órgãos e sistemas. No entanto, um aumento da relação da atividade ECA/ECA2 levará a um aumento da geração de Ang II e aumento do catabolismo da Ang-(1-7), favorecendo os efeitos pró-inflamatório, pró-fibrótico, proliferativo, pró-hipertensivos, entre outros. Por outro lado, uma relação oposta reduzirá os

níveis de Ang II e aumentará os níveis de Ang-(1-7). Os níveis aumentados de Ang-(1-7) induz efeitos anti-hipertensivos e anti-inflamatórios que impedem o remodelamento inadequado em diferentes estados patofisiológicos, tais como, hipertensão (Guimaraes et al., 2012; Santos et al., 2018), dislipidemia (Santos et al., 2013), infarto do miocárdio (Marques et al., 2011), enfisema (Bastos et al., 2020), hipertensão e fibrose pulmonar (Shenoy et al., 2014) e asma (Magalhaes et al., 2018; Magalhães et al., 2020; Magalhaes et al., 2016; Magalhaes et al., 2015; Rodrigues-Machado et al., 2013)

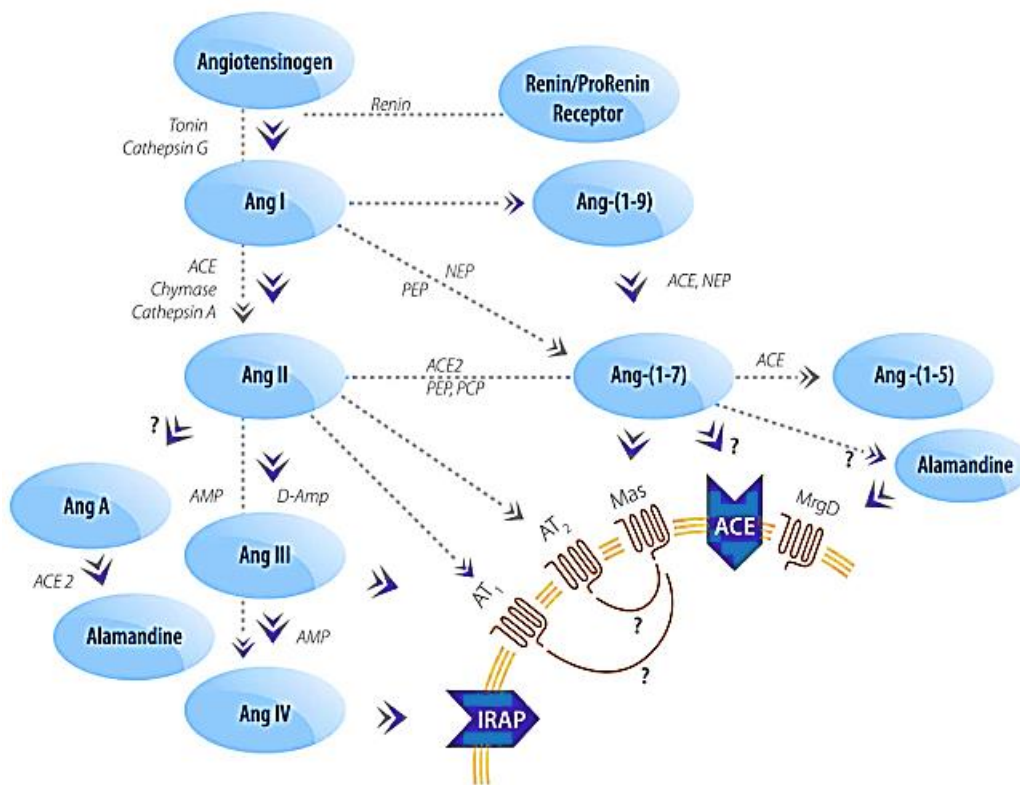


Figura 4. Visão atualizada e simplificada da cascata de formação dos peptídeos do sistema renina-angiotensina.

ECA; Enzima Conversora de Angiotensina I, ECA 2, AMP, Aminopeptidase; Ang, Angiotensina; AT1, Receptor de Angiotensina Tipo 1; AT2, Receptor de Angiotensina Tipo 2; D-Amp, dipeptidio aminopeptidase I–III; IRAP aminopeptidase insulino-regulatoria; Mas, receptor Mas; MrgD, receptor acoplado à proteína G Membro D da família Mas. Modificado de Santos, (2014).

Atualmente sabemos que o SRA não atua somente como um importante regulador da homeostase cardiovascular. Além de suas ações no sistema cardiovascular, um crescente corpo de evidências mostram o envolvimento do SRA nas doenças inflamatórias (Barroso et al., 2017; de Carvalho Santuchi et al., 2019; de Souza-Neto et al., 2019; Magalhaes et al., 2015; Tan, Liao, Zhou, Mei, & Wong, 2018). A presença de vários componentes do SRA em células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos, fornecem uma base molecular para a sua atuação nas doenças inflamatórias (Galvão et al., 2019). As ações pró inflamatórias exercidas pela ativação inapropriada do eixo clássico são atribuídas a Ang II. Ang II é uma molécula pró-inflamatória e um importante agente pró-fibrótico que sinaliza via receptor AT1, contribuindo para a deterioração progressiva de órgãos alvo (Benigni, Cassis, & Remuzzi, 2010).

Ang II é um dos principais peptídeos ativos do SRA, e seus níveis se encontram elevados no plasma de pacientes asmáticos após a exacerbação dos sintomas. Millar e cols. (1994), realizaram um estudo clínico no qual foi dosado os níveis circulantes de Ang II e níveis de renina no plasma de pacientes asmáticos, que se encontravam em diferentes níveis de severidade da asma. Os pacientes classificados como asma grave, apresentaram níveis elevados de renina e Ang II no primeiro, segundo e quinto dia após a exacerbação dos sintomas. Os pacientes que apresentavam asma leve ou crônica grave os níveis de renina ou Ang II estavam aumentados somente no quinto dia após a exacerbação. Em outra etapa desse mesmo trabalho, os pacientes com asma leve receberam por via intravenosa infusão de Ang II. A seguir a função pulmonar e os níveis plasmáticos de Ang II foram analisados. Os pacientes asmáticos que receberam Ang II apresentaram declínio da função pulmonar, evidenciado pela redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), o que sugere uma relação inversa entre os níveis plasmáticos de Ang II e a função pulmonar (Millar et al., 1994).

Após a constatação do efeito broncoconstritor da Ang II *in vivo*, seu efeito direto sobre amostras de anéis brônquios de pacientes asmáticos foi investigado *in vitro*. Anéis brônquios incubados com Ang II apresentaram uma resposta broncoconstritora que foi potencializada na presença de metacolina, um agonista colinérgico que induz constrição das vias aéreas (Millar, Nally, & Thomson, 1995).

Ang II sinaliza via receptor AT1 para exercer suas ações deletérias. Nesse sentido, um papel protetor proveniente do bloqueio do receptor de angiotensina do tipo 1(AT1) foi observado na redução da hiper-reatividade brônquica induzida por metacolina em pacientes asmáticos. Esses pacientes foram pré-tratados com 50 mg de Losartan uma vez por dia durante 6 dias antes de receberem inalação com metacolina. Como desfecho, foi observado que o bloqueio sistêmico do receptor AT1, inibiu a resposta broncoconstritora evocada por metacolina inalada, o que foi evidenciado pelo aumento da capacidade vital forçada desses pacientes (Myou et al., 2000). Um estudo experimental avaliou o efeito broncoconstritor mediado por Ang II em roedores. Anéis das vias aéreas de ratos winstar foram isolados e incubados com Ang II. Como resultado, o efeito broncoconstritor evocado por Ang II foi abolido na presença de Losartan, como também na presença de um inibidor da Proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). O que sugere que a interação Ang II/AT1 ativa essa via pró inflamatória.

Nesse estudo, mostrou-se a expressão de receptores AT1, AT2, angiotensinogênio e ECA nos pulmões, na traqueia e nos brônquios de roedores (Sakai et al., 2010). Em conjunto esses dados mostram que o eixo ECA/AngII/AT1 se encontra ativado na asma e contribui para a broncoconstrição das vias aéreas em humanos e roedores.

Estratégias farmacológicas que visam atenuar a ativação do eixo clássico do SRA, como o uso de bloqueadores de receptores da Ang II (BRAs) e inibidores da ECA (iECA), reduzem a amplitude dos processos inflamatórios e aumentam a expressão de componentes do eixo contraregulatório ACE2/ Ang-(1-7)/ Mas (Galvão et al., 2019; Santos et al., 2018; Sukumaran

et al., 2012; Sukumaran et al., 2011). Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa investigou o potencial terapêutico da via Ang-(1-7)/ Mas nas doenças pulmonares, como asma e enfisema.

No pulmão, o receptor Mas se encontra expresso no músculo liso do epitélio e vias aéreas, células do músculo liso vascular e endotélio (Magalhaes et al., 2015; Santos et al., 2018). O receptor Mas também foi identificado nas células do sistema imunológico, como células dendríticas, linfócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos alveolares, indicando um mecanismo celular para ações de Ang-(1-7) no sistema imunológico (Galvão et al., 2019). Nos últimos anos nós publicamos trabalhos que utilizam a estimulação do receptor Mas como um abordagem terapêutica promissora no tratamento da asma.

O eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ Mas foi avaliado como um potencial alvo terapêutico para a asma (Magalhaes et al., 2018; Magalhães et al., 2020; Magalhaes et al., 2016; Magalhaes et al., 2015; Rodrigues-Machado et al., 2013). Nesse sentido, o nosso grupo demonstrou que a estimulação do Mas através de Ang-(1-7) (Magalhaes et al., 2015) ou AVE 0991, um agonista do receptor Mas (Rodrigues-Machado et al., 2013) atenua a inflamação, hiperresponsividade e o remodelamento das vias aéreas. Esses efeitos foram associados à uma menor ativação de vias intracelulares que favorecem a diferenciação e sobrevivência de leucócitos, bem como a diferenciação de células Th2 (Magalhaes et al., 2015; Rodrigues-Machado et al., 2013).

Utilizando um modelo experimental de asma crônica, nós mostramos que o tratamento com AVE 0991, um agonista não peptídeo do receptor Mas, atenuou o remodelamento vascular pulmonar e o remodelamento das vias aéreas (Rodrigues-Machado et al., 2013). Resultados semelhantes foram obtidos quando os camundongos foram tratados com Ang-(1-7). Além disso, a Ang-(1-7) atenuou a hiperresponsividade das vias aéreas induzida por metacolina, como também reduziu os níveis de citocinas Th2. Os efeitos anti-inflamatórios da Ang-(1-7) foram associados a redução da fosforilação de ERK 1/2 (Magalhaes et al., 2015).

Animais com deleção genética do receptor Mas (Mas-Ko), apresentam uma resposta inflamatória exacerbada induzida pelo modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica. Nesses camundongos, a ausência do receptor Mas, aumentou o infiltrado celular, deposição de matriz extracelular, espessamento do parênquima alveolar, espessamento da camada muscular lisa das arteríolas pulmonares, aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias nos pulmões, quando comparado ao animal OVA WT (Magalhaes et al., 2016). Esses resultados estão de acordo com os dados publicados por (El-Hashim et al., 2012), que mostraram que o bloqueio farmacológico do receptor Mas utilizando o seu antagonista seletivo A779 aboli os efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos mediados pela Ang-(1-7).

Mais recentemente, estudos do nosso grupo também constataram que Ang-(1-7) desencadeia mecanismos pró-resolutivos em processos inflamatórios (Magalhaes et al., 2018). A resolução da inflamação é um processo ativo que permite cessar a inflamação e reestabelecer a homeostase tecidual. É um processo caracterizado pela prevenção do tráfico excessivo de leucócitos para o sítio inflamatório, desligamento intracelular de moléculas de sinalização associadas à produção de citocinas e sobrevivência de leucócitos, indução de apoptose de células inflamatórias que foram previamente recrutadas e promoção da depuração de leucócitos apoptóticos (eferocitose) (Alessandri et al., 2013). Tratamento com Ang-(1-7) no pico da inflamação eosinofílica induz aumento do número de eosinófilos expressando caspase 3, juntamente com maior número de eosinófilos apoptóticos, reduz a expressão de NF- κ B em eosinófilos, atenua a fosforilação de I κ B- α e ERK 1/2 e a expressão proteica de GATA3 no tecido pulmonar. Além disso, o tratamento com Ang-(1-7) aumenta a eferocitose contribuindo para o clearance de células apoptóticas no tecido pulmonar (Magalhaes et al., 2018). Assim, a Ang-(1-7) cumpriu todos os critérios para ser considerada uma molécula pró-resolutiva. Resultados semelhantes foram observados em um modelo experimental de artrite (Barroso et al., 2017).

1.3 Alamandina e o receptor MrgD

Mais recentemente, nosso grupo identificou um novo componente do SRA, o heptapeptídeo Alamandina [Des-Asp¹-Ala¹-Ang-(1-7)] (Lautner et al., 2013). Alamandina é um peptídeo endógeno e se encontra presente no plasma de humanos e roedores. Esse peptídeo pode ser gerado pela hidrólise da angiotensina A (Des-Asp¹-Ala¹-Ang II) através da ECA2 ou diretamente a partir da Ang-(1-7) através da descarboxilação do primeiro resíduo de aminoácido, ácido aspártico em alanina, por uma enzima ainda não identificada.

No seu trabalho de descoberta e caracterização do peptídeo Alamandina, Lautner e cols. (2013), descreveram os primeiros efeitos biológicos atribuídos ao novo componente do SRA. Experimentos funcionais utilizando anéis de aorta de camundongos FVBN, mostraram que Alamandina produz efeito vasodilatador dependente de endotélio e independente da participação do receptor Mas, pois o A779 (antagonista seletivo do receptor Mas), não inibiu o efeito vasodilatador da Alamandina. Células CHO transfectadas com o receptor acoplado à proteína G Membro D da família Mas (MrgD), também suportam o conceito que Alamandina interage com seu próprio receptor para induzir liberação de óxido nítrico (NO), de forma independente do receptor Mas. Utilizando ensaio de ligação Lautner e cols. (2013), mostraram que a Alamandina se liga ao MrgD com alta afinidade. Estudos mostraram que antagonistas do SRA também competem pela ligação ao MrgD, por exemplo, o D-Pro7, um antagonista do receptor Mas, a β -alanina, antagonista do MrgD, e o PD123319 classicamente um antagonista do receptor AT2 (Lautner et al., 2013; Soltani Hekmat, Javanmardi, Kouhpayeh, Baharamali, & Farjam, 2017).

No trabalho de descoberta e caracterização da Alamandina, seu potencial terapêutico também foi explorado. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram tratados por via oral com Alamandina. Como resultado, foi observado uma redução duradoura da pressão arterial (PA) após uma única administração da formulação oral de Alamandina. Além disso, a administração oral do mesmo composto, durante 7 dias atenuou a fibrose cardíaca induzida por isoproterenol em corações de ratos Wistar. Assim, foram demonstrados pela primeira vez os efeitos hipotensores e antifibróticos da Alamandina. (Lautner et al., 2013). Os principais efeitos da Alamandina estão sumarizados na figura 5.

O receptor MrgD foi primeiramente descrito em neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal de ratos e parece estar envolvido em somatossensibilidade (Dong, Han, Zylka, Simon, & Anderson, 2001). Porém, recentes estudos mostraram que o mesmo está expresso em diversos tipos celulares. O receptor MrgD está presente em cardiomiócitos, células endoteliais, músculo liso vascular, neurônios da retina, vasculatura da retina, células epiteliais do pigmento da retina (Habiyakare, Alsaadon, Mathai, Hayes, & Zulli, 2014; Jesus et al., 2018; Qaradakhi et al., 2017; Zhu, Verma, Prasad, & Li, 2020) Além disso, MrgD também está expresso em células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos (Da Silva et al., 2017; de Carvalho Santuchi et al., 2019).

Desde o trabalho pioneiro de Lautner e cols.(2013), outros trabalhos foram publicados mostrando a participação da Alamandina em diferentes modelos experimentais abordando principalmente suas ações cardiovasculares, que incluem redução da PA, prevenção de fibrose cardíaca e hipertrofia de cardiomiócitos como também vasorelaxamento em anéis de aorta (de Souza-Neto, Carvalho Santuchi, de Moraes, Campagnole-Santos, & da Silva, 2018; Liu et al., 2018; Wang, Liu, Chen, & Li, 2019).

Os efeitos cardioprotetores da Alamandina ocorrem via ativação da AMPK, que regula a produção de NO no coração. Jesus e cols., (2018), demonstraram que a Alamandina preveniu

o efeito hipertrófico de Ang II sobre cardiomiócitos neonatos de ratos Wistar. Em parte a liberação de NO induzida por Alamandina explica a cardioproteção exercida por esse peptídeo, uma vez que sabemos que NO é um importante agente anti-hipertrofico (Jesus et al., 2018).

Os efeitos antipertensivos e antifibroticos induzidos pela administração a longo prazo de Alamandina foram observados em SHR. A infusão crônica de Alamandina (50ug/kg/dia por 6 semanas) preveniu o desenvolvimento da hipertensão arterial induzindo fibrose cardíaca. Esse efeito anti-fibrótico induzido pelo tratamento com Alamandina foi acompanhada por redução da PA, melhora da função do ventrículo esquerdo e redução dos níveis de peptídeo atrial natriurético e peptídeo natriurético cerebral (Liu et al., 2018).

Mecanismos de ação da Alamandina na prevenção da hipertrofia cardíaca foram descritos utilizando cultura celular de fibroblastos e cardiomiócitos (Liu et al., 2018; Wang et al., 2019). Fibroblastos cardíacos provenientes de ratos Wistar- Kyoto foram incubados com Ang II, um importante e potente mediador pró-fibrótico. A utilização de Ang II em cultura de fibroblastos teve como intuito induzir e mimetizar a hipertrofia cardíaca observada nos animais SHR. A seguir os fibroblastos foram tratados com Alamandina (*in vitro*). Como desfecho, o tratamento com Alamandina suprimiu a ação da Ang II na ativação dos fibroblastos. O que foi traduzido em menor expressão gênica de colágeno I, III, alfa actina de músculo liso e Fator de crescimento do tecido conjuntivo (Wang et al., 2019).

O cardiomiócito é a principal célula alvo durante o desenvolvimento da hipertensão arterial sistólica (HAS). Nesse sentido foi avaliado o papel cardioprotetor da Alamandina em cultura de cardiomiócitos, os resultados obtidos *in vitro* confirmam os achados anteriores demonstrando um efeito antifibrótico da Alamandina *in vivo* (Liu et al., 2018). Alamandina suprimiu Ang II induzindo expansão da área transversal do cardiomiócitos em um mecanismo que envolve a redução da fosforilação de proteína cinase A (PKA) e redução da expressão de peptídeo atrial natriurético e peptídeo natriurético cerebral em cardiomiocitos (Liu et al., 2018).

Alamandina exerce um importante papel na proteção e atenuação da progressão de doenças cardiovasculares induzindo alterações estruturais no tecido cardíaco. Recentemente nosso grupo mostrou que a deleção genética do receptor MrgD (MrgD-KO) induz cardiomiopatia dilatada, redução da função sistólica e remodelamento ventricular (Oliveira et al., 2019).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica mediada por citocinas pró-inflamatórias, lipídios bioativos e acúmulo de leucócitos na placa de ateroma (Zhu et al., 2018). Um papel para Alamandina em um modelo de aterosclerose foi reportado por Da Silva e cols., (2017). Utilizando animais *ApoE* knockout, os autores mostraram que o tratamento crônico com Alamandina (infusão 24ug/kg/h por 4 semanas) reduziu a ativação de neutrófilos envolvidos na formação da placa de ateroma. O menor nível de ativação dessas células foi evidenciado pela redução dos níveis séricos de metaloproteinase 9 (MMP-9) e mieloperoxidase (MPO). *In vitro*, a Alamandina reduziu a capacidade de forbol-12-miristato-13-acetato (um potente ativador de neutrófilos) em ativar neutrófilos e conseqüentemente liberar seus grânulos contendo MMP-9 e MPO (Da Silva et al., 2017). Apesar de Alamandina induzir um efeito direto sobre a ativação de neutrófilos, não foi observada redução da porcentagem de macrófagos e neutrófilos dentro da placa aterosclerótica (Da Silva et al., 2017).

A disfunção vascular é uma característica presente em vasos não saudáveis. Essa condição patológica agride o endotélio e predispõe ao desenvolvimento de aterosclerose. Alamandina exerceu um efeito protetivo em anéis de aorta, submetidos a um modelo de disfunção vascular induzido por hiperhomocisteinemia, que tem como objetivo lesionar as células endoteliais e reduzir sua capacidade de liberar NO (Qaradakh et al., 2017).

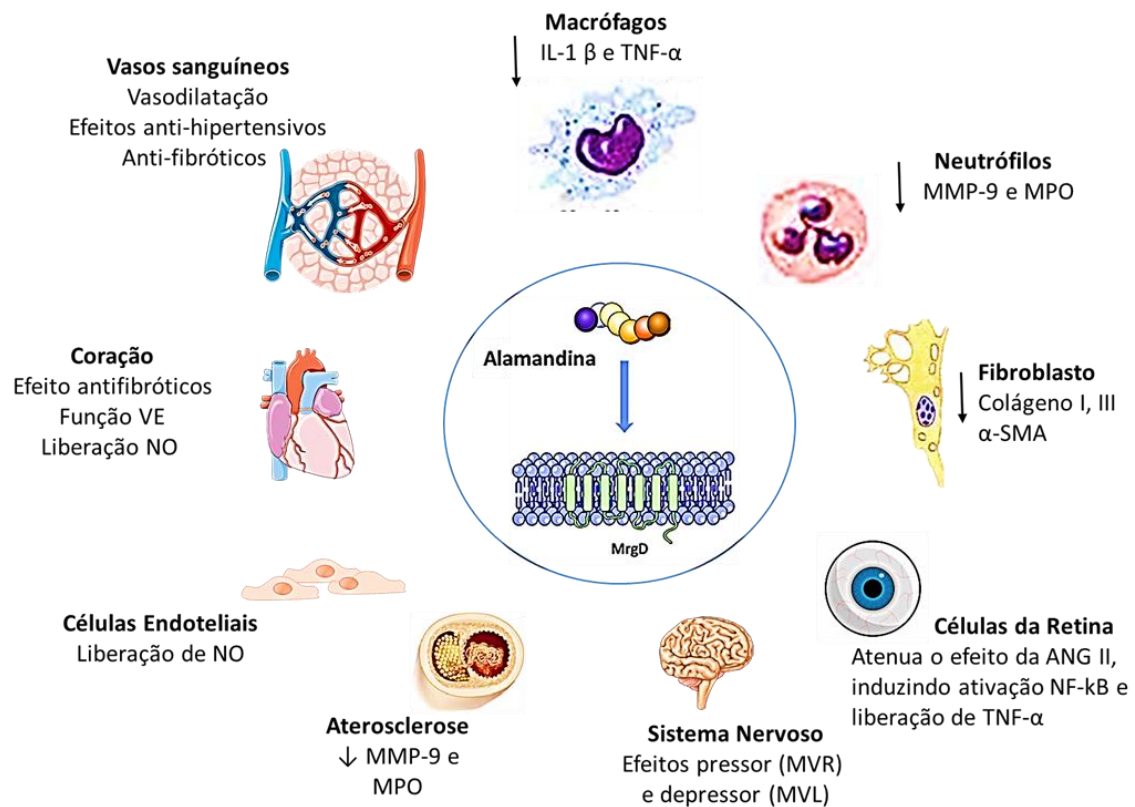


Figura 5. Efeitos da Alamandina em diferentes células e tecidos

Os primeiros efeitos descritos para a Alamandina se relacionam ao sistema cardiovascular. Alamandina induziu vasodilatação em anéis de aorta e atenuou fibrose cardíaca. Além disso, Alamandina induziu liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais. Em um modelo experimental de aterosclerose, o tratamento com Alamandina reduziu os níveis plasmáticos de metaloproteinase 9 (MMP9) e mieloperoxidase (MPO). No sistema nervoso central, Alamandina induziu efeito pressor na área rostroventrolateral do bulbo (MVR) e efeito depressor na área caudoventrolateral do bulbo (MVL). A presença do receptor MrgD foi mostrada em células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos. In vitro, a Alamandina reduziu a capacidade dessas células liberarem MPO, MMP-9, IL-1 β e TNF- α . Alamandina atenuou o efeito pró-fibrótico e pró-inflamatório da Ang II sobre fibroblastos e células da retina, respectivamente.

A inflamação é uma reação do hospedeiro a danos teciduais infecciosos ou estéreis e tem o objetivo de restaurar a homeostase tecidual (Sugimoto, Sousa, Pinho, Perretti, & Teixeira, 2016). Até o presente momento, o papel da Alamandina nos processos inflamatórios permanece em grande parte inexplorado. Em um modelo de pleurisia induzido por (LPS), uma única administração de Alamandina por via oral (no pico da inflamação neutrófila 8 hs após LPS) reduziu o número de neutrófilos recrutados para a cavidade pleural. Além disso, *in vitro*, Alamandina atenuou a liberação de mediadores pró inflamatórios liberados por macrófagos expressando um perfil pró-inflamatório (de Carvalho Santuchi et al., 2019). Li e cols. (2018), sugeriram um papel protetor para Alamandina em um modelo de sepse induzindo disfunção miocárdica.

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica induzida por um agente infeccioso (Li et al., 2018). A disfunção miocárdica induzida por sepse é uma das principais causas de mortes nas unidades de terapia intensiva. No trabalho de Li e cols. (2018), Alamandina foi administrada por via intravenosa (veia da cauda) 1 hora antes da administração de LPS. Os camundongos que foram tratados com Alamandina, apresentaram um menor perfil inflamatório. Alamandina atenuou o efeito pró inflamatório do LPS reduzindo os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 no tecido cardíaco. A sepse induziu aumento da expressão de caspase em cardiomiócitos, levando a morte dessas células e ao prejuízo da função cardíaca. Alamandina (*in vitro*) atenuou o efeito do LPS induzindo o aumento da expressão de caspase 3 e caspase 9, favorecendo a sobrevivência dos cardiomiócitos. Esses efeitos foram associados a inibição da vias de sinalização das MAPK, (Li et al., 2018).

Em um modelo experimental de sobrecarga pressórica por constrição da aorta transversa (TAC), camundongos tratados com uma formulação oral de Alamandina apresentaram menor nível de colágeno e expressão gênica de moléculas envolvidas no remodelamento vascular, como TGF- β e Metaloproteinase 2 (de Souza-Neto et al., 2019). Em conjunto, estes dados

sugerem que a Alamandina pode modular processos inflamatórios e atenuar o remodelamento tecidual. A hipótese do nosso grupo de pesquisa é que a Alamandina possa exercer efeitos imunoprotetores na inflamação pulmonar alérgica, prevenindo as principais alterações presentes em um modelo de asma, como inflamação e remodelamento das vias aéreas contribuindo assim com as vias contraregulatórias deste sistema.

1.4 Justificativa

Asma é uma doença heterogênea caracterizada por inflamação das vias aéreas e pela presença de diferentes sintomas respiratórios como sibilos, dispneia, produção exacerbada de muco, compressão torácica e tosse. Esses sintomas variam em intensidade e ao longo do tempo. A asma não tem cura, e as terapias atuais para o seu controle preconizam a associação de corticosteroides inalatórios e agonistas β_2 adrenérgicos com o objetivo de atenuar a inflamação e a broncoconstrição das vias aéreas. Apesar de atenuar os sintomas da asma, as terapias atuais não são capazes de impedir a progressão da doença. Além disso, uma parcela da população asmática (5-10%), não responde ao tratamento padrão preconizado (Holgate, 2015). Sendo assim, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da asma é altamente desejável.

A hiperativação do eixo ECA/Ang/II/AT1 está envolvida na fisiopatologia da inflamação, remodelamento pulmonar e hiperresponsividade das vias aéreas. Por outro lado, o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas possui efeitos na prevenção, no tratamento e na resolução da inflamação pulmonar alérgica. O peptídeo Alamandina e o receptor MrgD são novos componentes do SRA. A via Alamandina/MrgD exerce importantes ações protetoras sobre o sistema cardiovascular. Além disso, estudos recentes mostraram possíveis ações anti-inflamatórias mediadas pela Alamandina. Embora compartilhem de uma grande semelhança estrutural os peptídeos Ang-(1-7) e Alamandina atuam através de diferentes receptores e podem desencadear mecanismos intracelulares distintos. Desta forma, consideramos ser relevante estudos que tenham como objetivo investigar o efeito da Alamandina sobre vias inflamatórias e os possíveis mecanismos de imunoproteção. É nossa hipótese que a via Alamandina/receptor MrgD possa atenuar a inflamação pulmonar alérgica e representar uma via alternativa de contra-regulação do SRA na asma.

2. OBJETIVO GERAL E ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

2. OBJETIVO GERAL E ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito anti-inflamatório e anti-fibrótico mediado pela Alamandina em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica em camundongos.

2.2. Estratégias experimentais

Etapa I. Avaliar o efeito do tratamento com Alamandina na inflamação pulmonar alérgica

- a) Identificar a expressão do receptor MrgD em leucócitos provenientes do fluido do LBA
- b) Avaliar o efeito da Alamandina sob o acúmulo de leucócitos nos pulmões
- c) Avaliar os níveis pulmonares de mediadores inflamatórios (IL-4; IL-5; IL-13, IL-10, CCL2/MCP-1; CCL11/Eotaxina)
- d) Avaliar a ativação dos fatores de transcrição GATA3 e NF-kB no tecido pulmonar
- e) Avaliar a deposição de matriz extracelular em torno das vias aéreas
- f) Avaliar a inflamação peribrônquica, perivascular e do parênquima alveolar

Etapa II. Avaliar a resposta inflamatória e o remodelamento pulmonar em animais geneticamente deficientes para o receptor MrgD (MrgD-KO) submetidos a um modelo de inflamação pulmonar alérgica, induzido por OVA.

- a) Avaliar o acúmulo de células inflamatórias no pulmão de animais MrgD-KO
- b) Avaliar a atividade das enzimas MPO, EPO e NAG no pulmão dos animais MrgD-KO
- c) Avaliar a deposição de matriz extracelular em torno das vias aéreas

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos BALB/C machos do Centro de Bioterismo de nossa Instituição (CEBIO, UFMG) foram alojados em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com acesso livre a água e ração padrão. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o número CEUA 189/2017. Os animais (6-8 semanas de idade; pesando 20-25 g) foram alocados aleatoriamente em três grupos: (i) sensibilizado e desafiado com solução salina, grupo controle (CTRL); (ii) sensibilizado e desafiado com ovalbumina (OVA), grupo OVA; (iii) sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com Alamandina incluída em HP β CD, grupo (OVA+ALA).

Também foram utilizados camundongos machos da linhagem C57 Black6/J (controle selvagens- WT) e animais com deleção genética do receptor MrgD (MrgD-KO). Estes animais foram alocados aleatoriamente em diferentes grupos: (i) grupo controle sensibilizado e desafiado com solução salina (MrgD-WT-CTRL); (ii) grupo sensibilizado e desafiado com OVA (MrgD-WT-OVA); (iii) grupo controle sensibilizado e desafiado com salina (MrgD-KO-CTRL); (iv) Grupo sensibilizado e desafiado com OVA (MrgD-KO-OVA). Os animais da linhagem C57 Black6/J (WT e KO) foram obtidos no biotério de animais transgênicos do laboratório de hipertensão - INCT Nanobiofar do ICB-UFMG.

3.2 Imunização e desafio com ovalbumina

A sensibilização foi realizada com duas injeções de OVA (100 μ g /animal, i.p., Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluída em solução tampão fosfato salina (PBS, 0,2 ml) contendo hidróxido de alumínio (2%) no intervalo de 7 dias (Dias 0 e 7). A partir do 12º ao 19º dia do protocolo experimental os animais foram anestesiados diariamente (via subcutânea) com uma solução de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg) em seguida foi administrado por via

intranasal 10 µg de OVA diluída em PBS (20 µl). Na fase de sensibilização os animais do grupo CTRL receberam 0,2 ml de PBS (i.p) e posteriormente na fase de desafio receberam um volume de 20 µl de PBS por via intranasal, nos mesmos intervalos de tempo dos grupos OVA (Figura 6).

3.3 Tratamento com Alamandina

Os animais foram tratados com uma formulação farmacêutica de Alamandina incluída em hidroxipropil β-ciclodextrina (HPβCD). HPβCD é utilizado de maneira eficiente como um nanocarreador para a entrega de peptídeos no trato gastrointestinal. A inclusão do peptídeo nesse composto o protege o mesmo durante sua passagem pelo trato gastrointestinal impedindo que o mesmo seja degradado (Lautner et al., 2013; Marques et al., 2011). Do 12º ao 19º dia do protocolo experimental, os animais foram tratados diariamente com formulação oral de Alamandina.

Camundongos do grupo controle e OVA foram tratados com (82 µg/Kg de HPβCD diluída em água destilada). Os animais do grupo OVA+ALA foram tratados com Alamandina (50 µg/Kg) incluída em HPβCD (82 µg/Kg de HPβCD 100µl) por gavagem. A dose de Alamandina foi escolhida com base em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Lautner et al., 2013).

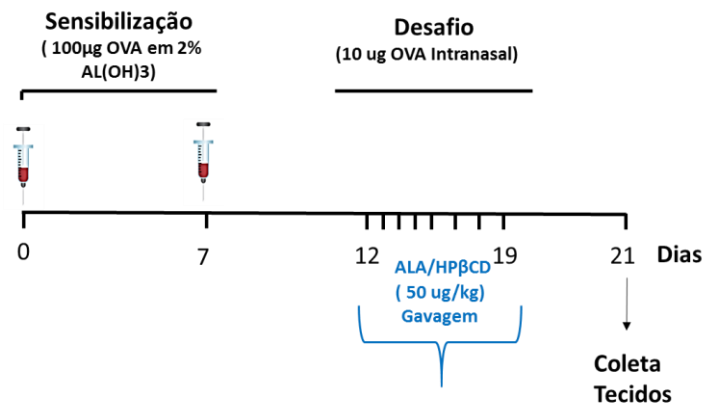


Figura 6. Protocolo experimental em camundongos Balb/c

Os animais foram imunizados por via intraperitoneal no 0 e 7º dia (ilustrado pelas seringas na figura) com ovalbumina (OVA; 100 µg /animal, contendo hidróxido de alumínio 2%). Do 12º ao 19º dia os animais foram desafiados com 10 µg de OVA por via intranasal e tratados com Alamandina incluída em ciclodexytrina (ALA/HPβCD; 50 µg/Kg) ou veículo HPβCD (82 µg/Kg) por via oral (gavagem). No 21º dia do protocolo os animais foram eutanasiados e os tecidos foram coletados.

Os camundongos machos da linhagem C57 Black6/J (controle selvagens-WT) e animais com deleção genética do receptor MrgD (MrgD-KO) foram submetidos ao mesmo protocolo experimental (Figura7) de imunização e desafio com OVA descrito acima.

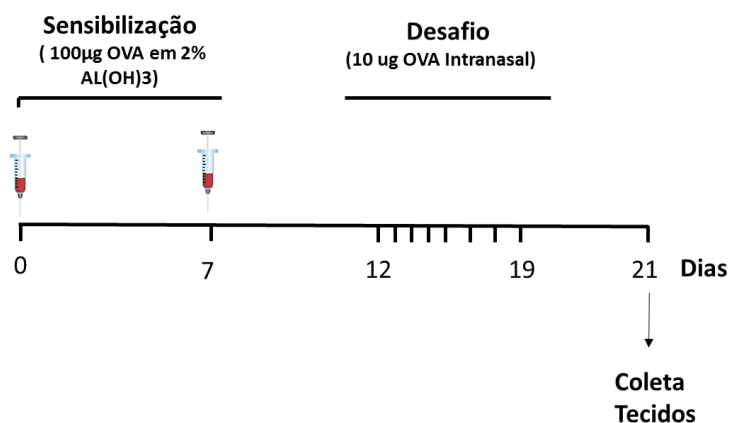


Figura 7. Protocolo experimental em Camundongos MrgD-KO

Os animais foram imunizados por via intraperitoneal no 0 e 7º dia (ilustrado pelas seringas na figura) com ovalbumina (OVA; 100 µg /animal, contendo AOH 2%). Do 12º ao 19º dia os animais foram desafiados com 10 µg de OVA por via intranasal. No 21º dia do protocolo os animais foram eutanasiados e os tecidos foram coletados.

3.4 Lavado broncoalveolar (LBA) e coleta dos tecidos

Quarenta e oito horas após o último desafio com OVA, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal. Após a anestesia, a traqueia foi exposta e isolada com um fio de sutura, a seguir foi realizada uma incisão na artéria carótida para a coleta de sangue. Após a coleta de sangue, foi realizado o LBA para a obtenção de leucócitos. A Traqueia de cada animal foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno (20G). A via aérea foi lavada com 2 ml de PBS gelado. O fluido do LBA recuperado foi centrifugado (1.700 rpm, 8 min, 4°C), o pellet foi ressuspenso em solução de PBS-BSA a 3%. O número total de leucócitos foi contado em câmara de Neubauer após a coloração com a solução de Turk. As células presentes no fluido do BAL foram centrifugadas (Shandon Cytospin III) e coradas com May-Grünwald-Giemsa. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por microscopia de imersão em óleo (objetiva de 100 ×), usando critérios morfológicos padrão para os diferentes tipos de celulares. Após a realização do LBA, o pulmão esquerdo foi recolhido para análise morfométrica e o pulmão direito foi removido, congelado em gelo seco e mantido a -80° C para posteriormente ser utilizado.

3.5 Determinação da atividade de Mieloperoxidase (MPO) e Peroxidase Eosinofílica (EPO)

O lóbulo médio do pulmão direito foi pesado e solubilizado em tampão fosfato de sódio, pH 5,4 (1ml/mg), as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas à 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C para posterior dosagem de citocinas. O precipitado foi ressuspenso em salina contendo EDTA (1ml/ mg de tecido), centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado NaCl 0,2% e NaCl1,6% contendo glicose 5% gelada (1ml/ mg de tecido). As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em tampão

fosfato contendo HTAB 5% e homogeneizado por 30 segundos (vortex). As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente por 3 vezes em nitrogênio líquido, e submetidas novamente à centrifugação e o sobrenadante coletado para o ensaio. Para se determinar a atividade da enzima MPO, 25 µl do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços em duplicata, incubado com 25 µl de tampão contendo TMB/H₂O₂ por 30 minutos a 37°C. Para interromper a reação foi adicionado 100 µl de H₂SO₄. A densidade óptica foi medida em 450 nm. Para se determinar a atividade da enzima EPO, 75 µl do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços, incubado com 75 µl de tampão mais OPD/H₂O₂ por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 µl de H₂SO₄ e a densidade óptica foi medida em 492 nm em leitor de ELISA.

3.6 Técnica para dosagem da atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG)

O precipitado obtido no processamento do pulmão, acima descrito, foi ressuspenso em 500 µl de solução salina 0,9% com Triton X-100 a 0,1% gelado. As amostras foram homogeneizadas em vórtex até a obtenção de uma suspensão homogênea e, posteriormente foram centrifugadas à 3.000 rpm durante 10 minutos. A seguir, 100µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços em duplicata e a estes foram adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminidase), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, e em seguida, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Por último, foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorvância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm.

3.7 Imunofluorescência

Em um conjunto separado de experimentos, as células do LBA foram centrifugadas a 1.200 rpm durante 5 minutos a 4°C e o pellet foi ressuspendido em PBS e foi realizada a contagem total de células. Um número total de 5×10^5 células foi levado para realizar a citocentrifugação (Cytospin; Shandon Lipshaw Inc., PA, EUA). As células foram fixadas em formaldeído a 4% em PBS (0,02 M, pH 7,4). Em seguida, as células foram incubadas com Fc Block (CD16/32, BD Biosciences, EUA) durante 1 hora para bloquear a ligação inespecífica. Sequencialmente, as células foram incubadas com anticorpo primário de coelho anti-MrgD (1: 300; Abcam, EUA) de um dia para o outro. As células foram depois lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho marcado com Alexa 488 durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas várias vezes com PBS (0,02 M, pH 7,4) e fechadas com meio de montagem de glicol (Sigma-Aldrich, EUA). Para coloração extracelular, o anticorpo foi adicionado diretamente às células. A coloração do controle foi obtida realizando o ensaio na ausência de anticorpo primário anti-MrgD. A análise da expressão de MrgD foi feita no microscópio confocal de varredura Zeiss LSM 880 com o software Zen Black (Carl Zeiss Microimaging LLC, Thornwood, NY, EUA) no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) de nossa instituição (UFMG). Os anticorpos utilizados foram: marcador nuclear fluorescente de iodeto de propídio (PI; 1: 1000, vermelho; Cell Signaling, EUA), Siglec-F (1: 100, azul; Cell Signaling, MA, EUA), receptor anti-MrgD (1: 300, verde; Abcam, EUA).

3.8 Análise histológica

A fibrose pulmonar foi avaliada em cortes pulmonares (4 µm) corados com tricromo de Gömori (Trichrome Stain LG Solution; Sigma-Aldrich, EUA) e PicroSirius Red (Sigma-Aldrich, EUA). Imagens digitais das vias aéreas obtidas com aumento de 200x foram

analisadas usando o software Image-Pro-Plus. Dez a doze áreas peribrônquicas por pulmão foram delineadas e quantificadas. Os resultados são expressos como a porcentagem da área de deposição de matriz extracelular e a porcentagem de deposição de colágeno. A análise da inflamação pulmonar foi avaliada em cortes pulmonares (4 µm) coradas com hematoxilina e eosina (H & E). A inflamação pulmonar foi avaliada de forma duplo-cega usando uma escala (escore histológico) de 1 a 4, onde a pontuação 1 correspondeu à ausência de inflamação; escore 2 - inflamação leve; escore 3 - inflamação moderada e escore 4- inflamação grave. Os escores foram atribuídos em quinze áreas (triagem do pulmão de cima para baixo) para cada tipo de estrutura (brônquios, arteríolas e alvéolos) de cada animal, com aumento de 200x (n=5-6 cada grupo) em um microscópio Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.9 Análise ELISA

Os níveis pulmonares de IL-4, IL-13, IL-10, CCL2 e CCL11 foram medidos pela técnica de ELISA utilizando kits comerciais Quantikine Elisa (R & D Systems, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de IL-5 foi mensurado por meio da técnica de ELISA usando o Duoset Kit comercial (R & D Systems, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em níveis de citocinas por pulmão (pg / mg).

3.10 Proteína medida por Western blotting

Amostras de proteínas totais (30 µg) extraídas do pulmão (n=4-5 de cada grupo) foram aplicadas em gel de poliacrilamida/ SDS 10% e depois transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas durante a noite com diferentes anticorpos primários: GATA3 (Rabbit anti-GATA3, 1: 500; Abcam Labs, Cambridge, UK); IκBα total (coelho anti-t-IκBα; 1: 1000; Cell Signaling, MA, EUA) ou IκBα fosforilado (coelho anti-p-IκBα; 1: 500; Cell Signaling, MA, EUA). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente [IRDye ® 680 IgG (H + L) de cabra anti-coelho conjugado

(policlonal) diluído a 1:10.000 (Li-COR Biosciences, NE, EUA)]. Os níveis foram normalizados para os níveis de β -actina na mesma amostra. A marcação das bandas foram visualizadas e quantificada em um Li-COR Odyssey Scanner (Biosciences, NE, EUA).

3.11 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm SEM. As comparações entre 3 ou mais grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls. As comparações entre os grupos de animais MrgD-KO foram realizadas por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. Todas as análises e gráficos foram realizados com o software GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Receptor MrgD está presente em leucócitos

Afim de identificar a presença do receptor MrgD nos leucócitos, nós avaliamos por imunofluorescência a expressão do receptor em células recolhidas do fluido do LBA. Como pode ser observado na Figura 8, o receptor MrgD (em verde) está expresso em eosinófilos (Figura 8A), macrófagos alveolares (Figura 8B), neutrófilos (Figura 8C) e macrófago recrutado (Figura 8D). A Figura 9 representa o controle da imunofluorescência.

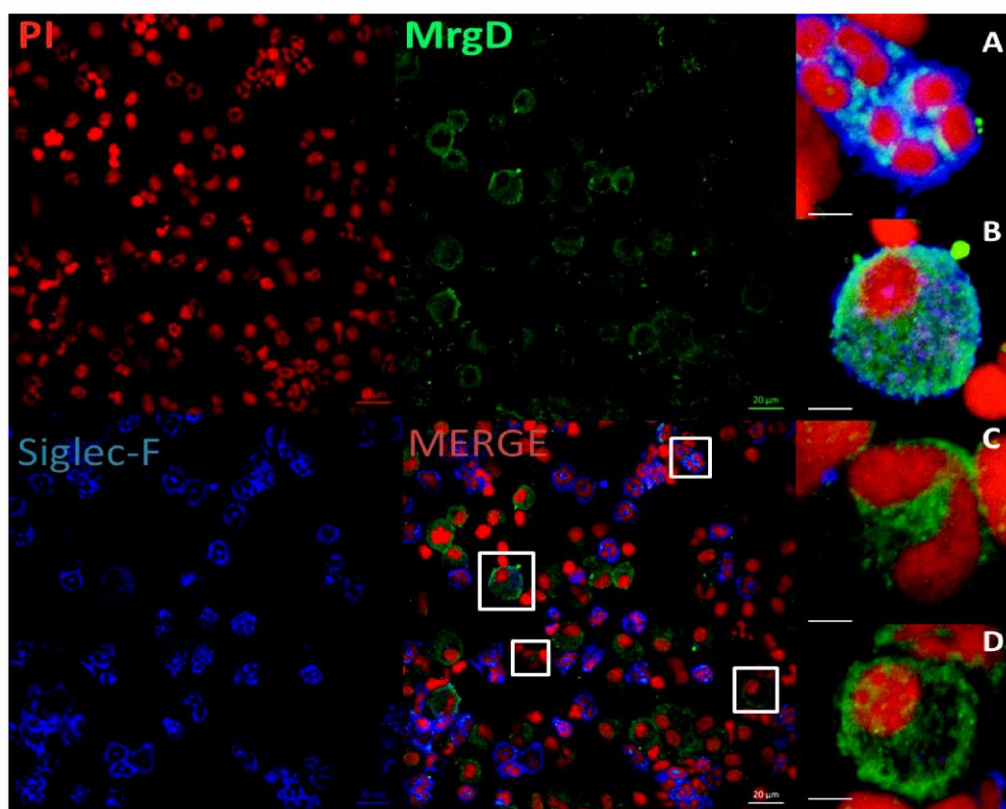


Figura 8. Marcação do receptor MrgD em leucócitos.

Imagens ilustrativas da expressão do receptor MrgD por imunofluorescência em eosinófilos (A), macrófagos (B,D) e neutrófilos (C). Iodeto de propídio (PI) em vermelho marcador nuclear; siglec F em azul, marcador de eosinófilo e macrófago alveolar; e receptor MrgD em verde e sobreposição das imagens (MERGE). Escala = 20 μm.

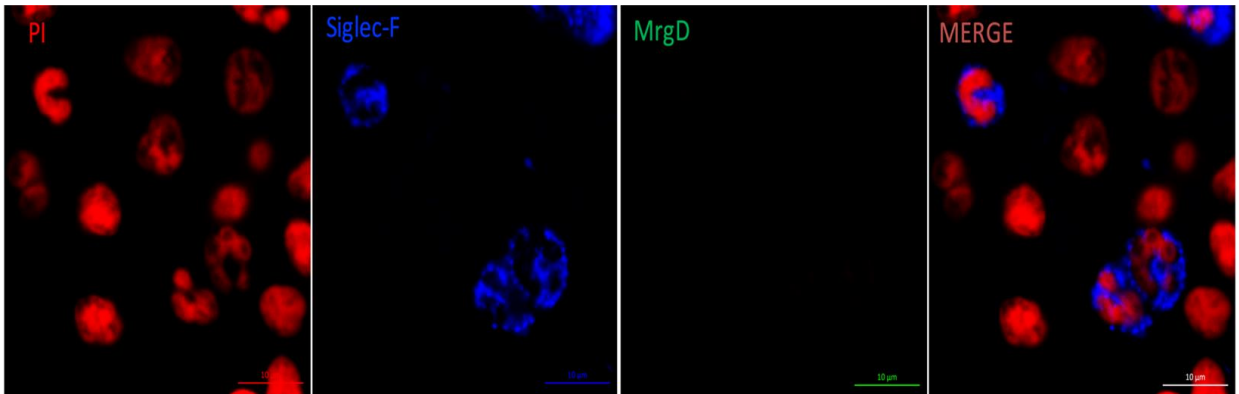


Figura 9. Controle negativo da imunofluorescência

Imagem obtida em microscópio confocal ilustrando o controle negativo da imunofluorescência em células provenientes do lavado broncoalveolar. Marcador fluorescente nuclear, iodeto de propídio (PI) em vermelho; marcador de eosinófilos e macrófagos alveolares siglec F em azul; Escala = 10 µm.

4.2 Tratamento com Alamandina previne o acúmulo de eosinófilos no pulmão

Após sensibilização e desafio com OVA, os pulmões dos camundongos apresentaram aumento do número de células totais ($11 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$ células vs $4.1 \times 10^5 \pm 0.75 \times 10^5$ células no grupo controle; Figura 10A). O aumento do número de células totais foi atenuado pelo tratamento com Alamandina ($4.5 \times 10^5 \pm 0.94 \times 10^5$ células no grupo OVA + ALA). Além disso, o tratamento oral com o composto de inclusão Alamandina/HP β CD preveniu o aumento de eosinófilos nos pulmões ($1.2 \times 10^5 \pm 0.34 \times 10^5$ cells vs $6.6 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ células, no grupo OVA; Figura 10B), sem alterar o número de células mononucleares ($3.3 \times 10^5 \pm 0.6 \times 10^5$ cells vs $4.4 \times 10^5 \pm 0.16 \times 10^5$ células, no grupo OVA; Figura 10C).

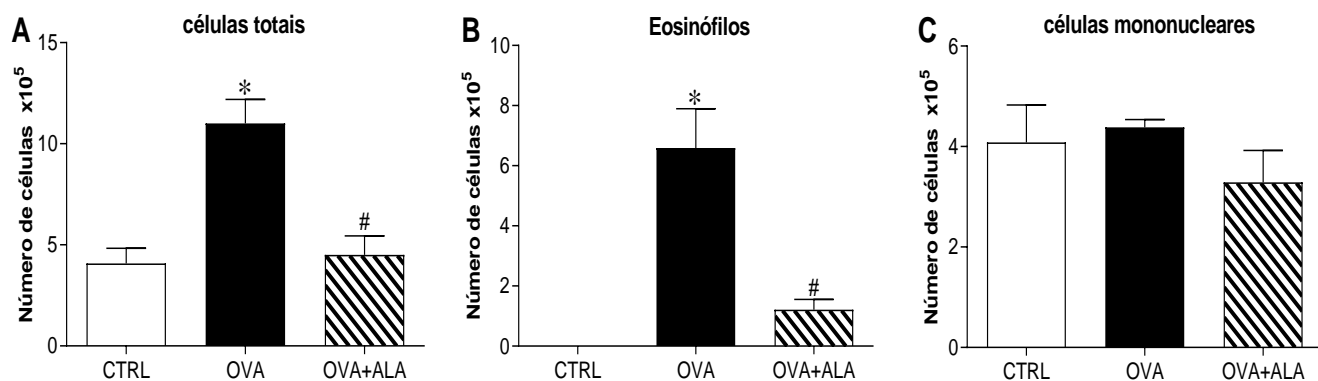


Figura 10. Leucócitos no fluido do lavado broncoalveolar

Número de células totais (A), eosinófilos (B) e células mononucleares (C) no Lavado broncoalveolar (LBA) de controle (CTRL, n=5), asmático (OVA, n=5) e camundongos asmáticos tratados com administração oral de Alamandine/HP β CD (OVA + ALA; n=5). Barras mostram a média \pm SEM. *p < 0,05 comparado ao grupo CTRL e #p < 0,05 comparado ao grupo OVA (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.3 Alamandina atenua o aumento de citocinas e quimiocinas no pulmão

A Figura 11 mostra níveis de citocinas e quimiocinas no pulmão. A Sensibilização e desafio com OVA induziu aumento dos níveis de IL-5, IL-13, CCL2, CCL11 (Figura 11B, C, E, G). IL-4 e IL-10 não se alteraram significativamente em camundongos OVA (Figura 11A, D, F). Como mostrado na Figura 11, o tratamento com a Alamandina preveniu o aumento da IL-13 ($37,4 \pm 3,7$ pg/mg vs $55,6 \pm 6,4$ pg/mg, no grupo OVA), CCL2 ($48,6 \pm 5,7$ pg/mg vs $84,0 \pm 11,0$ pg/mg, no grupo OVA) e CCL11 (525 ± 46 pg/mg vs $745,0 \pm 83,04$ pg/mg; no grupo OVA). No entanto, a Alamandina não alterou os níveis de IL-5 (128.434 ± 4541 pg/mg vs 104.452 ± 15.228 pg/mg no grupo OVA, Figura 11 B). Estes resultados mostram que a Alamandina reduz importantes citocinas e quimiocinas em um modelo de inflamação pulmonar alérgica.

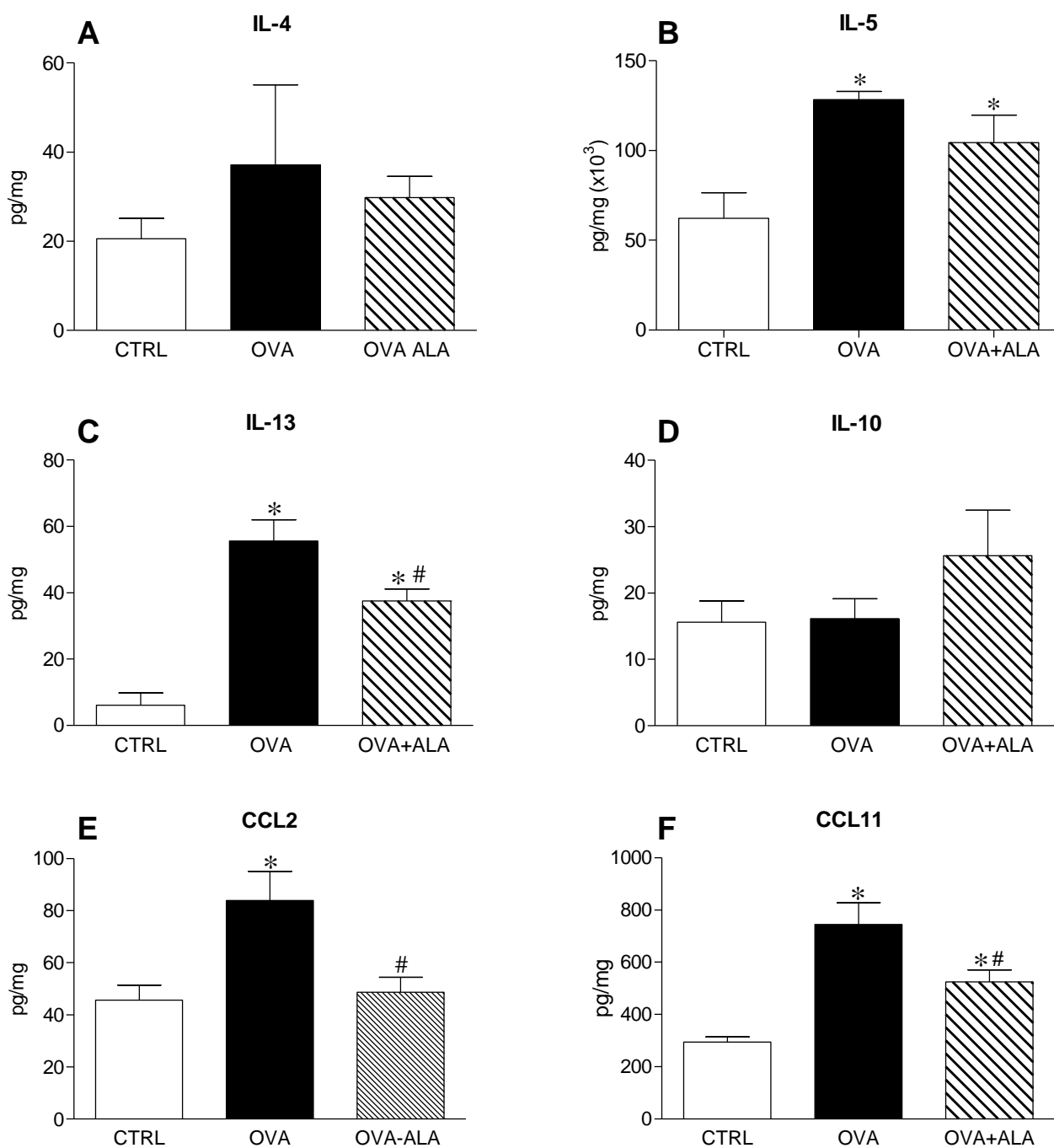


Figura 11. Nível de citocinas e quimiocinas no pulmão.

Níveis pulmonares de IL-4 (A); IL-5 (B); IL-13 (C); IL-10 (D); CCL2 (E); CCL11 (F) nos pulmões do grupo controle (CTRL n=5), grupo asmático (OVA, n=6-7) e camundongos asmático tratados com administração oral de Alamandine/HPβCD (OVA + ALA n=6-7). *p< 0,05 comparado a CTRL e #p< 0,05 comparado ao grupo OVA (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.4 Alamandina previne o aumento da expressão de GATA3 e I κ B- α no tecido pulmonar

A diferenciação das células Th2 está diretamente relacionada ao fator de transcrição GATA3. Camundongos desafiados com OVA apresentaram elevada ativação de GATA3. O tratamento com Alamandina atenuou a ativação desse fator de transcrição nos pulmões de camundongos desafiados com OVA ($0,0077 \pm 0,002$ vs $0,0237 \pm 0,007$ ua, no grupo OVA; Figura 12 A). O NF- κ B é um importante fator de transcrição envolvido na síntese de diversos mediadores inflamatórios. A ativação do NF- κ B ocorre quando ele se dissocia do I κ B- α , que o regulador negativo do NF- κ B. Nossos dados mostram que o tratamento oral com Alamandina atenuou significativamente o aumento da fosforilação de I κ B- α ($0,43 \pm 0,14$ a.u.) em comparação com o grupo desafiado por OVA ($0,82 \pm 0,12$ a.u. Figura 12 B).

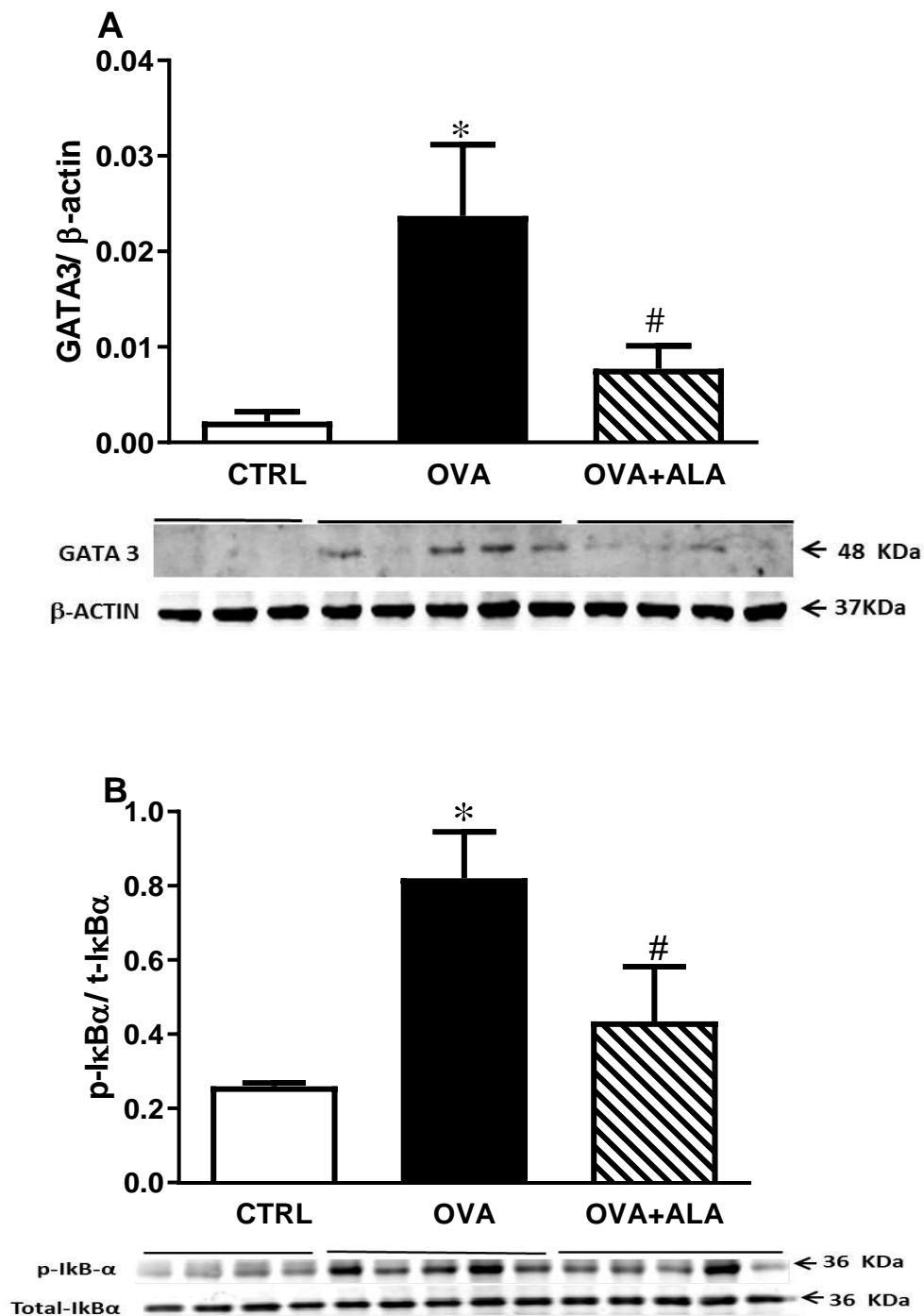


Figura 12. Expressão de GATA3 e IκB-α no pulmão

Expressão de GATA3 (A) e relação de IκB-α fosforilado e total (B) no pulmão do camundongos do grupo controle (CTRL n=4), asmático (OVA, n=5) e asmático tratado com a administração oral de Alamandina/HPβCD (OVA+ALA n=4). Barras mostram a média ± SEM da quantificação densitométrica por Western blotting. Abaixo de cada gráfico estão imagens de bandas representativas de cada grupo. O número á direita refere-se a massa molecular da proteína de interesse (em KDa). *p< 0,05 comparado ao CTRL; #p< 0,05 comparado ao OVA (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.5 Alamandina atenua o acúmulo celular no pulmão

A Figura 13 A-C mostra imagens representativas de cortes histológicos do pulmão evidenciando alterações estruturais e o acúmulo de células no tecido pulmonar. O desafio com OVA produziu aumento pronunciado na densidade de células inflamatórias ao redor das vias aéreas e dos vasos sanguíneos, em comparação com o grupo controle (Figura 13B e 13D). O tratamento com a Alamandina atenuou o infiltrado inflamatório nas regiões peribrônquica e perivascular do pulmão quando comparado ao grupo OVA, como pode ser observado nas imagens das Figuras 13B e 13C e pelo escore histológico ($2,09 \pm 0,22$ vs $2,60 \pm 0,13$, em camundongos OVA Figura 13D).

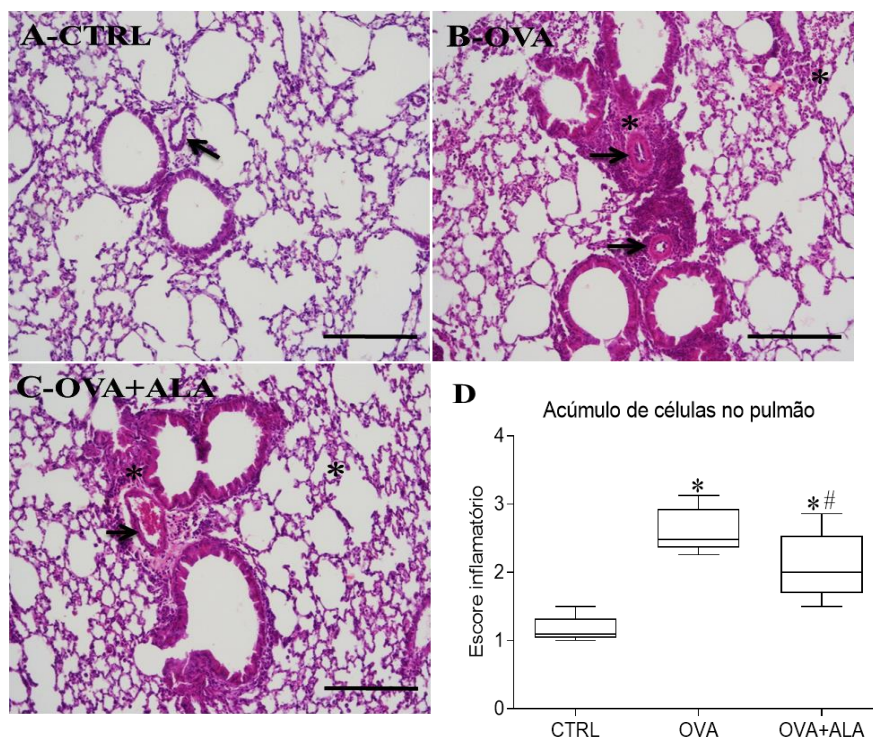


Figura 13. Escore da infiltração de células no pulmão.

Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão coradas com hematoxilina e eosina (H&E) de animais controle (A-CTRL), asmáticos (B-OVA) e asmáticos tratados com Alamandine/HP β CD (C-OVA+ALA) mostrando a infiltração de leucócitos nas regiões peribrônquica, perivascular e parênquima alveolar (asteriscos) e remodelamento vascular (setas). (D) Box plots do escore histológico do infiltrado de células inflamatórias em camundongos dos grupos CTRL, OVA e OVA + ALA (n=5-6). As caixas mostram o primeiro e o terceiro quartil, as barras mostram os intervalos de 10% e 90% e a linha horizontal representa o valor médio. *p < 0,05 comparado ao CTRL e #p < 0,05 comparado ao grupo OVA (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.6 Alamandina atenua a deposição de matriz extracelular nas vias aéreas

A Figura 14A-C apresenta imagens representativas das vias aéreas, mostrando alterações induzidas pela asma na deposição de matriz extracelular. A exposição à OVA aumentou significativamente a deposição de matriz extracelular nas vias aéreas e no parênquima pulmonar (Figura 14B e 14D) em comparação ao grupo CTRL (Figura 14A e 14D). Análises quantitativas mostraram que o tratamento com a Alamandina reduziu a deposição de matriz extracelular em camundongos desafiados ($29 \pm 3\%$ vs $39 \pm 3\%$, no grupo OVA; Fig. 14C e D). Além disso, os animais tratados com Alamandina apresentaram menor deposição de colágeno nas vias aéreas ($4,66 \pm 0,55\%$, a.u) em comparação aos animais do grupo não tratado, OVA ($14,02 \pm 2,12\%$, a.u; Figura 15).

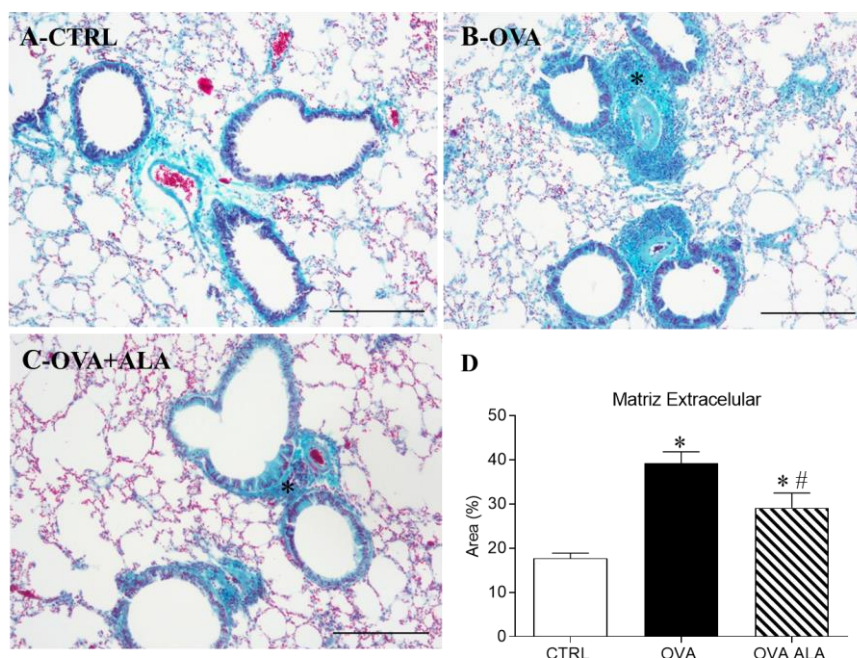


Figura 14. Deposição de matriz extracelular no pulmão.

Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão coradas com tricrômio de Gomori de animais controle (A-CTRL; n=7), asmáticos (B-OVA; n=6) e asmáticos tratados com Alamandine/HP β CD (C-OVA+ALA; n=6) mostrando a deposição de matriz extracelular ao redor das vias aéreas e no parênquima pulmonar (asteriscos). Em D porcentagem da área corada. Barras mostram a média \pm SEM. *p < 0,05 comparado ao CTRL e # p < 0,05 comparado ao grupo OVA (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

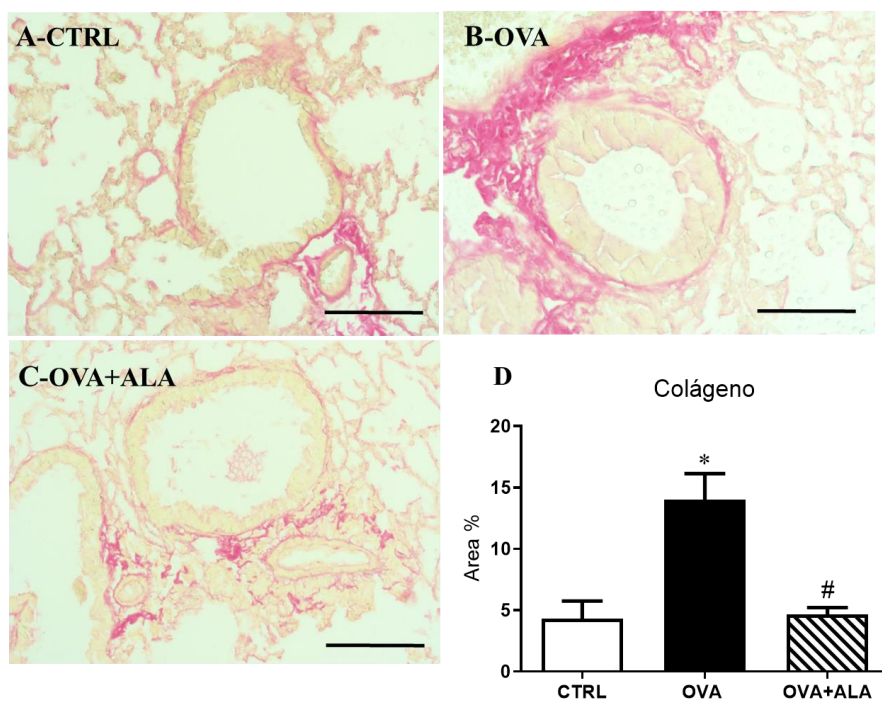


Figura 15. Deposição total de colágeno nos pulmões

Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão coradas com Picrosirius red de animais controle (A-CTRL; n=4), asmáticos (B-OVA; n=5) e asmáticos tratados com Alamandine/HPβCD (C-OVA+ALA; n=5) mostrando a deposição total de colágeno nas vias aéreas. Em D porcentagem da área corada. Barras mostram a média ± SEM. *p< 0,05 comparado ao CTRL e #p< 0,05 em comparação ao grupo OVA (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

4.7 Presença de eosinófilos no fluido do LBA de animais MrgD-KO submetidos a modelo de asma alérgica

Para compreendermos qual o papel do receptor MrgD na inflamação pulmonar alérgica, induzimos asma nos animais MrgD-ko . Após o desafio com OVA, o número de células totais nos pulmões dos animais WT não foi diferente dos animais do grupo controle (Figura 16A). No entanto, os animais MrgD-KO-OVA apresentaram aumento do número de células totais no fluido do LBA em relação a seu respectivo controle (Figura 16A). O desafio com OVA induziu aumento do número de eosinófilos no fluido do LBA tanto nos animais MrgD-WT-OVA quanto nos animais MrgD-KO-OVA (Figura 16B). O número de eosinófilos não foi significativamente maior no fluido do LBA dos animais MrgD-KO-OVA quando comparados aos animais MrgD-WT-OVA (Figura 16B). Não foi observado alteração no número de células mononucleares no LBA dos animais dos diferentes grupos (Figura 16C).

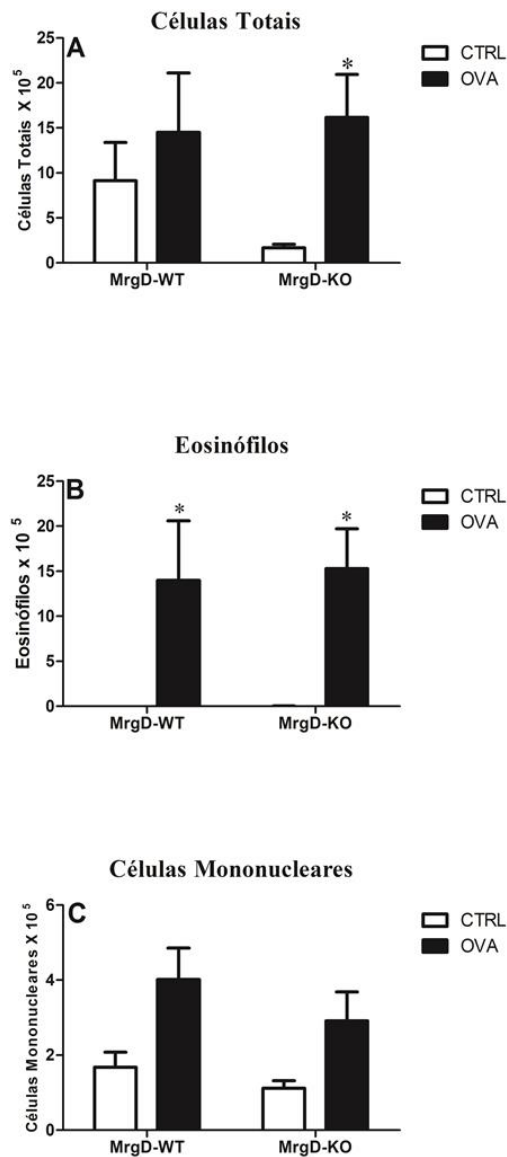


Figura 16. Quantificação de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de camundongos com deleção genética do receptor MrgD.

Número de células totais (A), número de eosinófilos (B) e número de células mononucleares (C). 48 horas após o último desafio com OVA (n=4-5) *p< 0.05 comparado com respectivo controle; # p<0.05 comparado com MrgD-WT-OVA (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

4.8 Infiltração de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no pulmão dos animais MrgD-KO submetidos a modelo de asma alérgica

O grau de infiltração de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos no pulmão foi avaliado pela atividade das enzimas EPO, MPO e NAG, respectivamente. A atividade destas enzimas apresenta correlação específica com a presença dessas células no tecido. A sensibilização e o desafio com OVA induziu aumento da atividade das enzimas EPO e MPO no pulmão dos animais MrgD-WT-OVA quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 17A e 17B). No entanto, os animais MrgD-KO-OVA não apresentaram alteração significativa na atividade destas enzimas, EPO e MPO (Figura 17A e 17B). Sendo que, os animais MrgD-KO-OVA a atividade das enzimas EPO e MPO foi menor do que a atividade destas enzimas nos animais do grupo MrgD-WT-OVA (Figura 17A e 17B). Não foi observada alteração da atividade da NAG em nenhum dos grupos experimentais (Figura 17C). Em conjunto esses dados sugerem que camundongos MrgD-KO sensibilizados e desafiados com OVA apresentam atenuação do acúmulo de eosinófilos e neutrófilos no pulmão.

Em relação ao espessamento do parênquima alveolar, a Figura 18 mostra que não houve diferença estatística entre os grupos MrgD-KO-OVA e MrgD-KO-CTRL (Figura 18C, 18D e 18E). Há tendência de aumento do parênquima alveolar nos animais do grupo MrgD-WT-OVA (Figura 18B e 18E) em relação aos animais controle (Figura 18A e 18E). Finalmente, a espessura do parênquima alveolar dos animais MrgD-KO-OVA foi estatisticamente menor quando comparado aos animais do grupo MrgD-WT-OVA (Figura 18E).

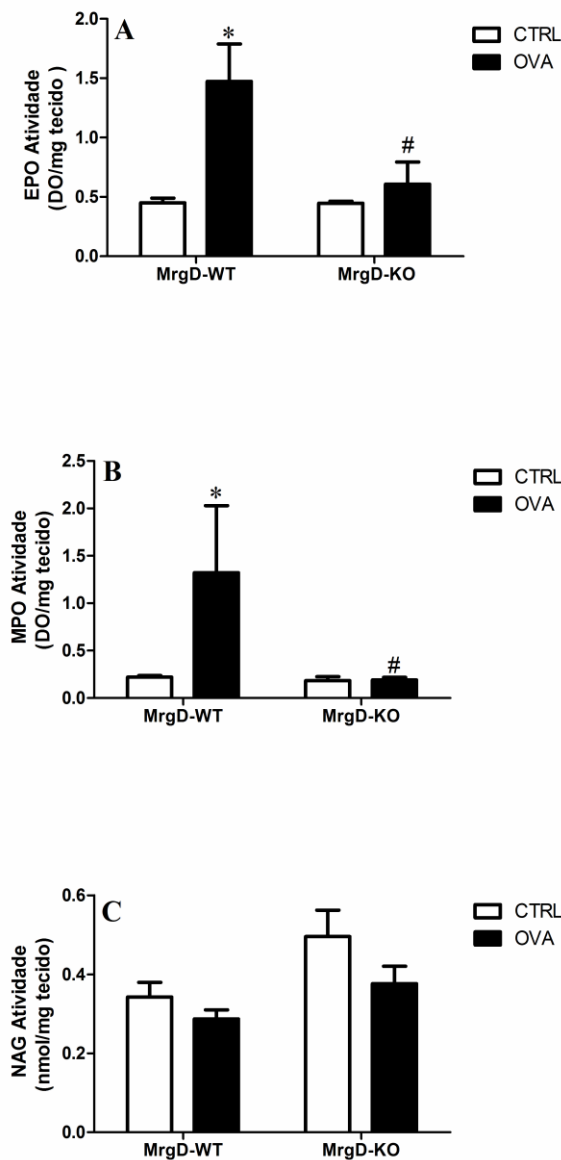


Figura 17. Atividade enzimática nos pulmões de animais com deleção genética do receptor MrgD

Atividade das enzimas (A) Peroxidase eosinofílica (EPO, DO/mg de tecido), (B) Mieloperoxidase, (MPO, DO/mg de tecido) e (C) N-acetilglucosaminidase (nmol/mg tecido) no pulmão de camundongos com deleção genética do receptor MrgD sensibilizados e desafiados com OVA. (n=5 cada grupo); *p< 0,05 comparado com respectivo controle; # p<0,05 comparado ao MrgD-WT-OVA (ANOVA duas vias seguido do teste de Bonferroni teste).

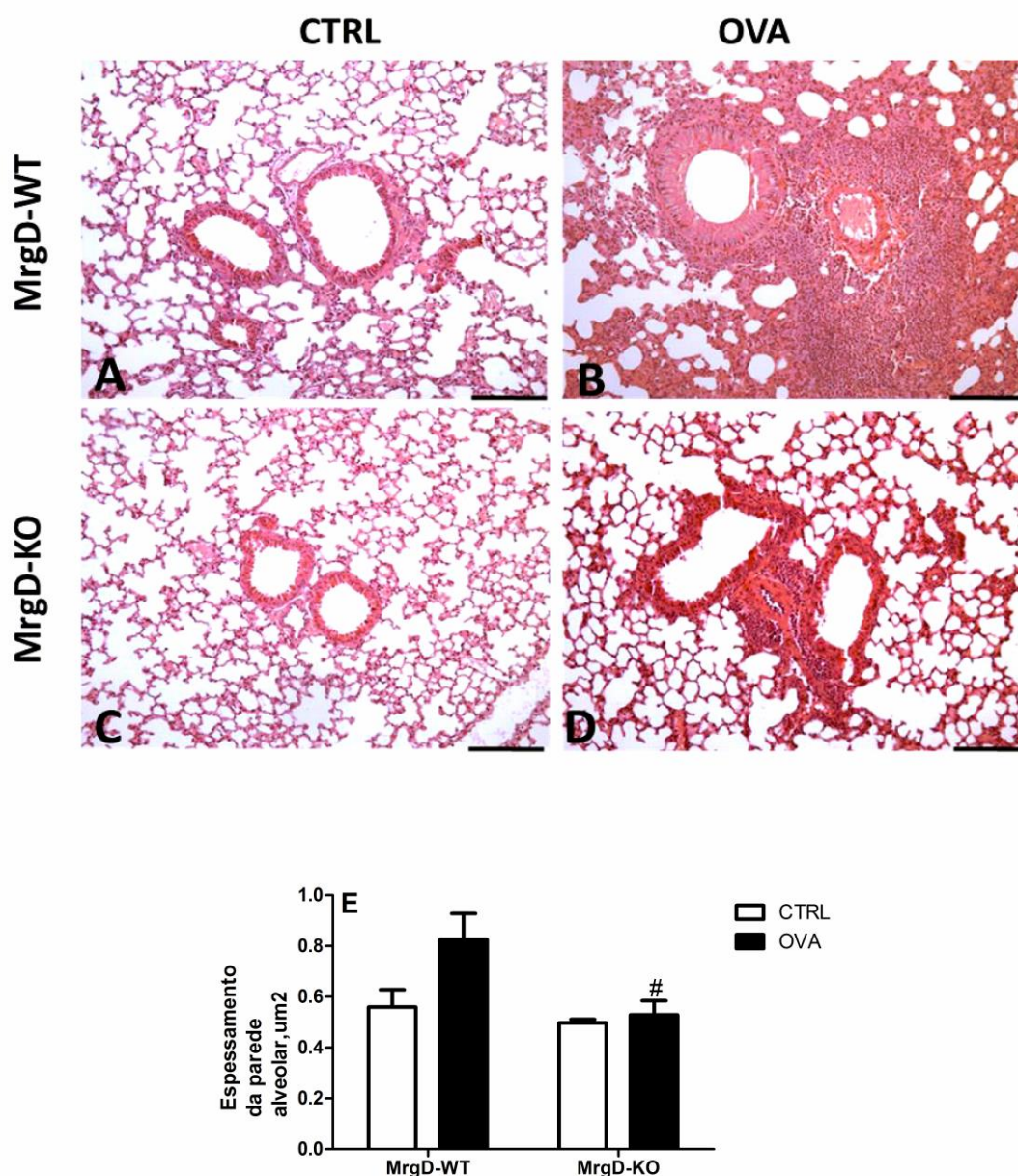


Figura 18. Espessamento da parede alveolar de animais com deleção genética do receptor MrgD.

Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão de camundongos MrgD-WT(A), MrgD-WT-OVA (B), MrgD-KO-CTRL (C) e MrgD-KO-OVA (D) coradas com hematoxilina e eosina. (E) Análise quantitativa do espessamento do parênquima alveolar; (n=5, cada grupo), *p < 0,05 comparado com respectivo controle; #p < 0,05 comparado com MrgD-WT-OVA (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.9 Avaliação do acúmulo de células inflamatórias em diferentes regiões do pulmão em camundongos MrgD-KO submetidos ao modelo de asma alérgica

Utilizando um score inflamatório avaliamos o acúmulo de células inflamatórias em diferentes regiões do pulmão de animais sensibilizados e desafiados com OVA. Nos animais dos grupos MrgD-WT-OVA e MrgD-KO-OVA, o infiltrado inflamatório estava aumentado nas regiões peribronquial e perivascular do pulmão quando comparado ao seu respectivo grupo controle (Figura 19A e 19B). No entanto, o aumento de infiltrado na região perivascular dos MrgD-KO-OVA foi estatisticamente menor que nos animais MrgD-WT-OVA. Não foi observado alteração do infiltrado de células inflamatórias na região do parênquima pulmonar de MrgD-WT ou MrgD-KO (Figura 19C).

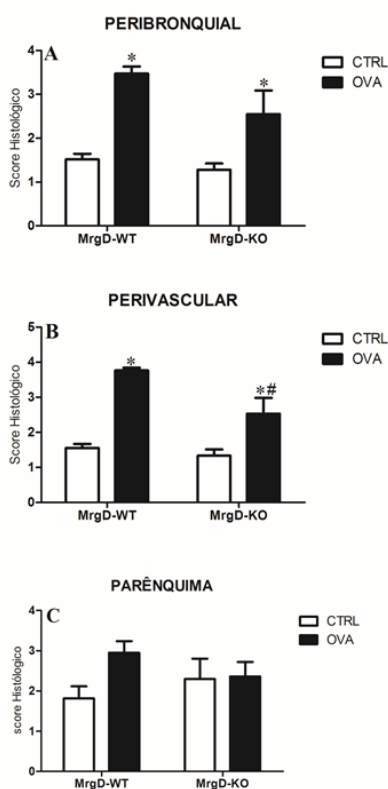


Figura 19. Escore histológico de células inflamatórias infiltradas em diferentes áreas do pulmão.

Acúmulo de células inflamatórias na região peribronquial (A), região perivascular (B) e região do parênquima pulmonar (C). (n=5, cada grupo), *p< 0.05 comparado com respectivo controle; #p< 0.05 comparado com MrgDWT-OVA (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.10 Avaliação do remodelamento das vias aéreas de camundongos MrgD-KO submetidos ao modelo de asma alérgica

A figura 20 mostra a deposição de colágeno no pulmão dos animais MrgD WT e KO sensibilizados e desafiados com OVA. O desafio com OVA induziu aumento semelhante na deposição de matriz extracelular nas vias aéreas nos animais MrgD-WT-OVA e MrgD-KO-OVA, em comparação com seus respectivos controles (Figura 20), sugerindo que a deleção genética do receptor MrgD não altera o remodelamento de vias aéreas induzido por OVA.

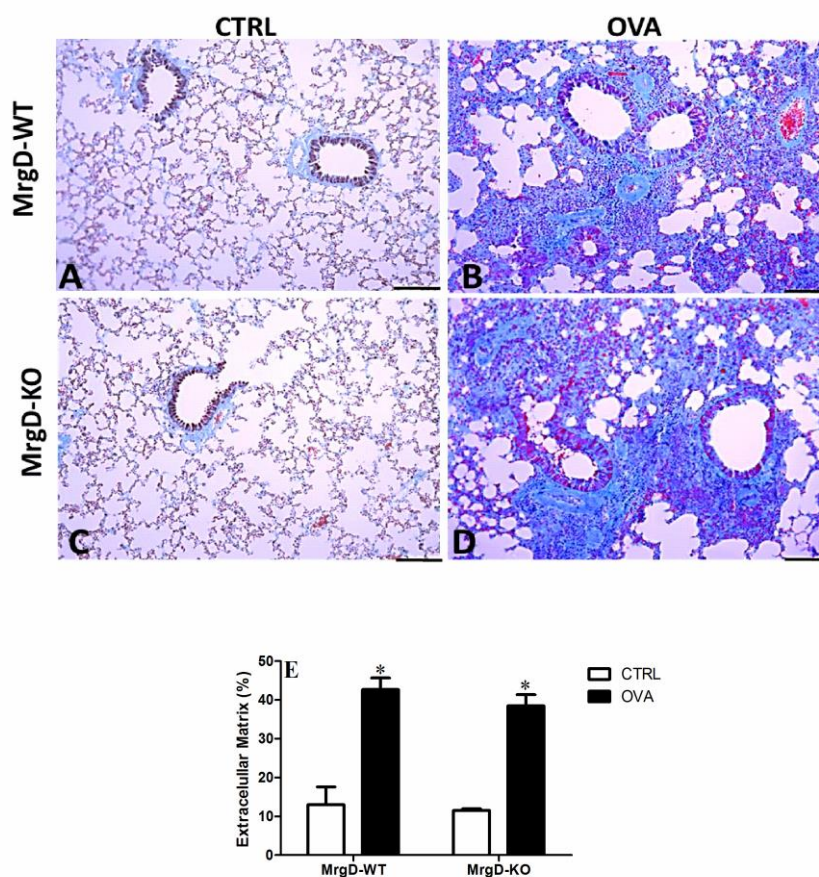


Figura 20. Deposição de colágeno nas vias aéreas de animais com deleção genética do receptor MrgD. Imagens representativas de cortes histológicos do pulmão.

Camundongos MrgD-WT-CTRL (A), MrgD-WT-OVA (B), MrgD-KO-CTRL (C) e MrgD-KO-OVA (D) corados com tricromio de Gomori. (E) Análise quantitativa da deposição de matriz extracelular nas vias aéreas. (n=5, cada grupo); * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, mostramos que o receptor MrgD está expresso em neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e macrófagos alveolares. Além disso, o tratamento com formulação oral de Alamandina em camundongos com inflamação pulmonar alérgica induziu: (i) redução do número de eosinófilos no pulmão; (ii) redução dos níveis de mediadores inflamatórios; (iii) atenuação da expressão do GATA3 e NF- κ B; (iv) e prevenção da deposição de matriz extracelular. Nesse estudo mostramos efeito anti-inflamatório e anti-fibrótico desencadeado pela Alamandina na inflamação pulmonar alérgica. Nossos dados reforçam que a Alamandina é um peptídeo contrarregulador do SRA, podendo se tornar um alvo adicional para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias.

Estudos na literatura que mostram o efeito da Alamandina no contexto inflamatório ainda são escassos. No presente estudo, a ação anti-inflamatória da Alamandina foi demonstrada pela redução do número de células totais e de eosinófilos recolhidos no LBA, bem como, por redução do escore inflamatório no pulmão de camundongos submetidos ao modelo de asma. Além disso, o tratamento por via oral com Alamandina atenuou o infiltrado celular no pulmão e reduziu a ativação de GATA3, NF- κ B e os níveis de CCL11, CCL2 e IL-13 nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.

A sensibilização ao alérgeno e o perfil de citocinas secretadas direcionam a resposta imune para uma polarização de linfócitos Th2. Nesse sentido, o GATA3 é o principal fator de transcrição que controla a diferenciação de células Th2. A diferenciação, ativação e liberação de citocinas a partir de células Th2 está intimamente ligada ao fator de transcrição GATA3 (Nakamura et al., 1999; Ray & Cohn, 1999; Zhu et al., 2004).

Nosso estudo mostrou que o tratamento por via oral com Alamandina, atenuou a expressão de GATA3 nos pulmões de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Esse resultado sugere que Alamandina atenuou o desenvolvimento da inflamação pulmonar

alérgica. Estudos clínicos demonstraram que a expressão do gene GATA3 nas células recolhidas do LBA aumenta após desafio com alérgeno em pacientes com asma leve (Erpenbeck et al., 2006; Ray & Cohn, 1999). Em um estudo experimental células Th2 murino com deleção de GATA3 são incapazes de liberar IL-5 e IL-13 (Zhou et al., 2019). Juntos, esses dados sugerem um papel essencial para o GATA3 na resposta imune dependente da ativação de linfócitos Th2 (Schuliga, 2015). Nossos dados mostram que a Alamandina pode minimizar esse processo.

A ativação de NF- κ B consiste em uma importante via inflamatória relacionada à sobrevivência de células inflamatórias e à síntese de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão em doenças pulmonares. Assim, a supressão da ativação NF- κ B é um alvo desejável em uma proposta terapêutica que visa ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas (Holgate & Polosa, 2008). Em estudos anteriores, nosso grupo mostrou que o modelo experimental de asma induzida por OVA aumenta a fosforilação do IKB- α nos pulmões e este aumento está associado ao processo inflamatório e ao reparo tecidual.

A relevância do NF- κ B na inflamação pulmonar alérgica foi demonstrada com a utilização de camundongos com deleção genética da subunidade p50 de NF κ -B. Ao serem desafiados com OVA esses animais foram incapazes de desenvolver inflamação eosinofílica das vias aéreas em comparação com os animais WT. Mais especificamente, o número de eosinófilos e os níveis de IL-4, IL-5 e eotaxina-1 estavam reduzidos quando comparado aos animais WT (Yang et al., 1998). No presente estudo, mostramos que Alamandina atenua a fosforilação de p-IKB- α nos pulmões de animais com inflamação pulmonar alérgica. Portanto, os efeitos mediados pela Alamandina, pelo menos em parte, estão relacionados a supressão do NF- κ B.

A redução de eosinófilos e CCL11/ eotaxina-1 nos pulmões sugere que a Alamandina possui ações importante sobre mecanismos fisiopatológicos na inflamação pulmonar alérgica.

A eotaxina-1 é um poderoso e seletivo quimioatraente de eosinófilos. Células pulmonares, tais como células epiteliais, células da musculatura lisa das vias aéreas, macrófagos alveolares, bem como, eosinófilos produzem eotaxina-1 que conseqüentemente aumenta o infiltrado de eosinófilos no tecido pulmonar. Um estudo clínico mostrou que após desafio com alérgeno níveis elevados de eotaxina-1 foram encontrados em células de biópsias brônquicas e no LBA de indivíduos asmáticos (Brown et al., 1998). Além disso, altos níveis de eotaxina-1 se correlacionam com o aumento de eosinófilos ativados e a redução da função pulmonar nos indivíduos asmáticos (Brown et al., 1998). A eotaxina-1 também contribui para que os eosinófilos sejam ativados e seus grânulos tóxicos sejam liberados. Um estudo *in vitro* mostrou que eosinófilos obtidos de pacientes asmáticos quando na presença de eotaxina-1, liberam proteína catiônica eosinofílica (Kampen et al., 2000). O aumento do número de eosinófilos no escarro ou no sangue periférico é um bom marcador para futuras exacerbações na asma e está associado ao declínio da função pulmonar. Sendo assim, indivíduos asmáticos que apresentam asma de difícil controle fazem o uso de altas doses de corticoides inalatórios para suprimir a inflamação das vias aéreas (Fulkerson & Rothenberg, 2013; Tran, Khattry, Ke, Ward, & Gossage, 2014).

A redução da migração e sobrevivência de eosinófilos no tecido pulmonar é um fator importante a ser considerado em estratégias terapêuticas para tratar a inflamação na asma. Nesse sentido, a Alamandina parece ser relevante para suprimir o infiltrado inflamatório, predominantemente eosinofílico, nos pulmões de camundongos com inflamação pulmonar alérgica (Gonzalo et al., 1996; Williams, 2015). De maneira semelhante, em um trabalho recente do nosso grupo, observou-se que a formulação oral de Alamandina reduziu a densidade do infiltrado celular na camada adventícia da aorta de camundongos submetidos a sobrecarga pressórica por constrição da aorta transversa. Esses achados foram acompanhados por redução

da expressão de genes pró-inflamatórios, como, CCL2, TNF- α e IL-1 β na artéria transversa (de Souza-Neto et al., 2019).

CCL2 é um quimioatraente para monócitos, linfócitos e basófilos, que regula a adesão celular por meio da ativação de integrinas β 1 (Ashida, Arai, Yamasaki, & Kita, 2001). Durante a inflamação alérgica CCL2 é amplamente expressa no pulmão (Gonzalo et al., 1996). A importância de CCL2 na asma foi demonstrada pela utilização de camundongos transgênicos que superexpressam CCL2 em pneumócitos tipo II e a secretam no espaço broncoalveolar induzindo um expressivo recrutamento de monócitos e linfócitos para os pulmões (Gunn, Nelken, Liao, & Williams, 1997). O acúmulo de células mononucleares atraídas por elevados níveis de CCL2 foi abolido pela neutralização dessa quimiocina com a utilização de anticorpo anti-CCL2 (Gunn et al., 1997). Também utilizando anticorpos neutralizantes para impedir a ação de CCL2, Gonzalo e cols. (1998), mostraram que o bloqueio de CCL2 atenuou a hiperresponsividade das vias aéreas induzida por metacolina e reduziu os níveis de leucotrienos (LT4) no fluido do LBA em um modelo murinho de asma (Gonzalo et al., 1996).

No presente estudo, mostramos que Alamandina reduziu os níveis pulmonares de CCL2, no entanto, o número de células mononucleares no fluido do LBA não se alterou. Esses resultados sugerem que as células mononucleares encontradas no LBA poderiam ser macrófagos expressando um perfil anti-inflamatório/pró-resolutivo ou até mesmo linfócitos T regulatórios. Estes últimos responsáveis pela produção de mediadores que suprimem a inflamação, como, TGF- β e IL-10 (Noval Rivas & Chatila, 2016). Ao analisarmos os níveis de IL-10 no tecido pulmonar observamos que tanto o grupo CTRL como o grupo OVA apresentaram níveis semelhantes de IL-10, no entanto, os níveis de IL-10 estão elevados nos animais OVA+ALA, apesar desse aumento não ter alcançado significância estatística. Estudos futuros utilizando por exemplo citometria de fluxo, serão necessários para se analisar o perfil celular e inflamatório do LBA de animais asmáticos tratados com Alamandina. Desta forma,

poderemos avaliar o papel da Alamandina sobre o recrutamento de células T regulatórias e macrófagos expressando um perfil pró resolutivo. Uma primeira evidência de um papel pró-resolutivo para Alamandina foi obtido por de Carvalho Santuchi e cols. (2019). Utilizando um modelo de pleurisia induzida por LPS esses autores mostraram que a formulação oral de Alamandina administrada no pico da inflamação neutrófilica (8 horas após o LPS) reduziu o número de neutrófilos sem alterar o número de células mononucleares, sugerindo que macrófagos com perfil pró-resolutivo permanecem na pleura para realizar o clearance de neutrófilos apoptóticos .(de Carvalho Santuchi et al., 2019)

Neste modelo de pleurisia, o LPS induz um grande influxo leucócitos para a cavidade pleural, que é caracterizada por infiltração neutrofílica, com resolução da resposta inflamatória em 48 horas, quando os neutrófilos são escassos e o número de células mononucleares é máximo. Quando analisados por citometria de fluxo observou-se que Alamandina reduziu o número de macrófagos que expressavam um perfil pró-inflamatório (M1) e mostrou uma tendência em aumentar o número de macrófagos que expressam um perfil pró-resolutivo (de Carvalho Santuchi et al., 2019). Em conjunto, esses resultados mostram um papel importante da Alamandina atenuando o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão.

O tratamento com Alamandina também atenuou os níveis de IL-13 nos pulmões de camundongos desafiados por OVA. A IL-13 juntamente com a IL-4 é responsável por estimular a produção de IgE pelas células B (Gour & Wills-Karp, 2015). Além disso, a IL-13 também desempenha um papel importante no remodelamento das vias aéreas. Firszt e cols. (2014) mostraram que a IL-13 é necessária para a ativação da produção de MMP2 por fibroblastos das vias aéreas de pacientes asmáticos. Além disso, na presença de IL-13, os fibroblastos aumentam sua capacidade de sintetizar TGF- β 1 e colágeno I (Firszt et al., 2014). No entanto, quando essas células são tratadas com inibidores de metaloproteinases, a produção de colágeno

I e TGF- β 1 é atenuada, mostrando que o efeito pró-fibrótico da IL-13 depende da ativação da MMP2 nos fibroblastos das vias aéreas (Firszt et al., 2014). Em nosso estudo mostramos que a Alamandina atenuou a expressão de IL-13 e a deposição de matriz extracelular e de colágeno no pulmão. Esses dados mostram um possível mecanismo para o efeito anti-fibrótico da Alamandina na fisiopatologia da asma.

A IgE é o anticorpo que transmite sensibilidade aos alérgenos e contribui de forma importante para a manutenção da resposta imune Th2 (Gould & Sutton, 2008). Embora tenhamos mostrado redução da inflamação das vias aéreas pela diminuição do número de eosinófilos no fluido LBA, não determinamos os níveis séricos de IgE. Esta é uma das limitações de nosso estudo. Estudos futuros deverão avaliar o efeito do tratamento com Alamandina sobre os níveis de IgE.

Fibrose subepitelial e hipertrofia do músculo liso são algumas das principais alterações estruturais presentes nas vias aéreas de pacientes asmáticos (Bousquet, Jeffery, Busse, Johnson, & Vignola, 2000). A deposição da matriz extracelular contribui para o remodelamento das vias aéreas, com conseqüente diminuição da função pulmonar (Pascual & Peters, 2005). Neste estudo, o tratamento com Alamandina preveniu a deposição de matriz extracelular e de colágeno nas vias aéreas em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Recentemente, nosso grupo mostrou que a Alamandina exerce efeitos anti-fibróticos no coração (Lautner et al., 2013). Como também em um modelo de remodelamento vascular induzido por sobrecarga de pressão da aorta transversa (de Souza-Neto et al., 2019). Neste modelo de remodelamento vascular, o tratamento oral com Alamandina atenuou a deposição de colágeno total, a expressão de colágeno III, TGF- β 1 e reduziu a atividade e expressão de MMP2 na aorta (de Souza-Neto et al., 2019).

Na asma, as terapias atuais não são capazes de reverter a fibrose pulmonar induzida pela inflamação crônica, como pode se exemplificar pelos trabalhos publicados por (Chakir, Hamid, Bossé, Boulet, & Laviolette, 2002; Chakir et al., 2003). Assim, o efeito da Almandina é muito promissor como um alvo farmacológico adicional para o controle de doenças inflamatórias pulmonares.

No presente estudo mostramos que a indução de inflamação pulmonar alérgica nos camundongos com deficiência genética para o receptor MrgD resultou em uma resposta inflamatória semelhante a observada no animal WT-OVA. O que sugere que a ausência funcional do receptor MrgD não altera o curso da inflamação pulmonar. Uma possibilidade para explicar estes efeitos seria a atuação de outros componentes do SRA como o eixo ECA2/Ang-(1-7)/Receptor Mas. Vários estudos de nosso laboratório (Magalhaes et al., 2018; Magalhaes et al., 2016; Magalhaes et al., 2015; Rodrigues-Machado et al., 2013) e outros grupos de pesquisa (El-Hashim et al., 2019; El-Hashim et al., 2012), mostraram que a via Ang-(1-7)/ Receptor Mas exerce imunoproteção no desenvolvimento da inflamação pulmonar alérgica. Tratamento com Ang-(1-7) reduziu o número de eosinófilos, mediadores inflamatórios e o remodelamento do tecido pulmonar em modelo experimental de asma. Além disso, diversos trabalhos mostram que Ang-(1-7) via receptor Mas é essencial para mitigar diferentes processos inflamatórios, como na artrite, miocardite, DPOC, lesão pulmonar aguda, hipertensão pulmonar, pleurisia (Tan et al., 2018; Santos et al., 2018).

Contrapondo os resultados de inflamação e remodelamento pulmonar observados nos animais MrgD-KO, a deleção genética do receptor Mas resultou em um intenso grau de inflamação e remodelamento pulmonar em uma linhagem de camundongos (FVB/N) que são menos susceptíveis ao modelo experimental de asma (Magalhaes et al., 2016). Assim, é possível que a ausência da interação Ang-(1-7)/Mas seja um mecanismo crítico para contrabalançar o processo inflamatório. Outra possibilidade, está relacionada aos níveis pulmonares de

Alamandina, que podem estar muito reduzidos e, neste caso, a falta do receptor MrgD pode não alterar o processo inflamatório. Em estudo clínico foi mostrado que pacientes com fibrose pulmonar idiopática apresentam uma redução marcante (3x menor em relação ao grupo controle) dos níveis plasmáticos de Alamandina. E a redução dos níveis de Alamandina apresentou alta correlação com os níveis de pressão na artéria pulmonar. De forma interessante, não foi observado diferença entre os níveis de Ang-(1-7) entre pacientes com fibrose pulmonar idiopática e indivíduos saudáveis (Taís Salvi, Robson Augusto Souza, & Katya, 2019). A falta de medida dos níveis plasmáticos e pulmonares dos principais efetores do SRA, Ang-(1-7), Ang II e Alamandina, em animais asmáticos é uma limitação do nosso estudo e deverá ser realizado em estudos futuros. O entendimento da similaridade, diferença e sobreposição dos mecanismos de ação das vias Alamandina/MrgD e Ang-(1-7)/Mas ainda precisa ser ampliado. De qualquer forma, nosso estudo mostra que a administração de Alamandina é benéfica para atenuar a inflamação e remodelamento pulmonar na asma.

O envolvimento da Ang II na fisiopatologia das doenças inflamatórias já era reconhecido. No final da década de 90 e início dos anos 2000 foram publicados os primeiros trabalhos mostrando que a Ang II potencializava a inflamação e hiperresponsividade brônquica tanto em modelos experimentais como em pacientes asmáticos (Millar et al., 1994; Millar et al., 1995; Myou et al., 2000) Nesse sentido, foi mostrado que indivíduos asmáticos que fizeram uso de losartan (antagonista do receptor AT1) por 6 dias apresentaram redução da hiperresponsividade das vias aéreas induzida por metacolina (Myou et al., 2000). Em estudos anteriores mostramos que na asma experimental os níveis de Ang II encontram-se aumentados e a razão Ang-(1-7)/Ang II está reduzida, sugerindo que a Ang II contribui para a inflamação e o remodelamento pulmonar na asma. O efeito observado pelo bloqueio do receptor AT1 poderia também ser, pelo menos em parte, mediado pela formação de Ang-(1-7) ou Alamandina. Uma vez que a Ang II aumentada na inflamação pulmonar alérgica poderia ser

convertida em Ang-(1-7) por meio da ação da ECA2. Além disso, a Alamandina poderia ser formada diretamente a partir de Ang A ou Ang-(1-7) por descarboxilação de seu resíduo de aspartato. No entanto, uma enzima seletiva responsável por esta ação ainda não foi descrita. Assim ainda não é possível avaliar a atividade de formação de Alamandina a partir de Ang-(1-7) ou Ang II na condição normal ou inflamatória.

Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa contribuiu para o avanço do conhecimento no que se refere ao papel da Ang-(1-7) na inflamação. Mostramos que o tratamento com Ang-(1-7)/Mas previne, reverte e induz a resolução da inflamação pulmonar alérgica. No presente estudo mostramos que a Alamandina também é um peptídeo contrarregulador do SRA na inflamação pulmonar. Desta forma, é nossa hipótese que estratégias que levem a aumento dos níveis de Ang-(1-7) e/ou Alamandina podem ser altamente benéficas para o tratamento de doenças inflamatórias, sobretudo para atender a demanda daqueles pacientes que não respondem a terapias atuais.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento com Alamandina em camundongos sensibilizados e desafiados por OVA diminuiu a infiltração de eosinófilos, a produção de mediadores inflamatórios e o remodelamento pulmonar. Destacamos que, os efeitos protetores da Alamandina envolvem a redução da expressão de GATA3, NF-kB, CCL2, CCL11/eotaxina-1 e IL-13. Portanto, o aumento dos níveis de Alamandina é um mecanismo importante para atenuar as cascatas inflamatórias envolvidas na asma alérgica, apoiando a hipótese de que a Alamandina é um importante efector contra-regulatório adicional da SRA na fisiopatologia das doenças inflamatórias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alessandri, A. L., Sousa, L. P., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Pinho, V., & Teixeira, M. M. 2013. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther*, 139(2): 189-212.
- Ashida, N., Arai, H., Yamasaki, M., & Kita, T. 2001. Differential signaling for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *Ann N Y Acad Sci*, 947: 387-389.
- Barroso, L. C., Magalhaes, G. S., Galvão, I., Reis, A. C., Souza, D. G., Sousa, L. P., Santos, R. A. S., Campagnole-Santos, M. J., Pinho, V., & Teixeira, M. M. 2017. Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Neutrophilic Inflammation in a Model of Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Front Immunol*, 8: 1596
- Bastos, A. C., Magalhães, G. S., Gregório, J. F., Matos, N. A., Motta-Santos, D., Bezerra, F. S., Santos, R. A. S., Campagnole Santos, M. J., & Rodrigues-Machado, M. G. 2020. Oral formulation angiotensin-(1-7) therapy attenuates pulmonary and systemic damage in mice with emphysema induced by elastase. *Immunobiology*, 225(2): 151893.
- Bégin, P., & Nadeau, K. C. 2014. Epigenetic regulation of asthma and allergic disease. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 10(1): 27-27.
- Benigni, A., Cassis, P., & Remuzzi, G. 2010. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*, 2(7): 247-257.
- Bentley, A. M., Durham, S. R., Robinson, D. S., Menz, G., Storz, C., Cromwell, O., Kay, A. B., & Wardlaw, A. J. 1993. Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 92(6): 857-868.
- Bergeron, C., Tulic, M. K., & Hamid, Q. 2010. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Can Respir J*, 17(4): e85-93.
- Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J. Y., Barneon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony-Lafontaine, J., Godard, P., & et al. 1990a. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*, 323(15): 1033-1039.
- Bousquet, J., Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M., & Vignola, A. M. 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(5): 1720-1745.
- Brown, J. R., Kleimberg, J., Marini, M., Sun, G., Bellini, A., & Mattoli, S. 1998. Kinetics of eotaxin expression and its relationship to eosinophil accumulation and activation in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after allergen inhalation. *Clin Exp Immunol*, 114(2): 137-146.

- Carlson, M., Håkansson, L., Kämpe, M., Stålenheim, G., Peterson, C., & Venge, P. 1992. Degranulation of eosinophils from pollen-atopic patients with asthma is increased during pollen season. *J Allergy Clin Immunol*, 89(1 Pt 1): 131-139.
- Chakir, J., Hamid, Q., Bossé, M., Boulet, L. P., & Laviolette, M. 2002. Bronchial inflammation in corticosteroid-sensitive and corticosteroid-resistant asthma at baseline and on oral corticosteroid treatment. *Clin Exp Allergy*, 32(4): 578-582.
- Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., Boulet, L. P., & Hamid, Q. 2003. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*, 111(6): 1293-1298.
- Christian, F., Smith, E. L., & Carmody, R. J. 2016. The Regulation of NF-κB Subunits by Phosphorylation. *Cells*, 5(1).
- Christman, J. W., Sadikot, R. T., & Blackwell, T. S. 2000. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. *Chest*, 117(5): 1482-1487.
- Da Silva, A. R., Lenglet, S., Carbone, F., Burger, F., Roth, A., Liberale, L., Bonaventura, A., Dallegri, F., Stergiopoulos, N., Santos, R. A., Mach, F., Fraga-Silva, R. A., & Montecucco, F. 2017. Alamandine abrogates neutrophil degranulation in atherosclerotic mice. *Eur J Clin Invest*, 47(2): 117-128.
- Dantzer, J. A., & Wood, R. A. 2018. The use of omalizumab in allergen immunotherapy. *Clin Exp Allergy*, 48(3): 232-240.
- de Carvalho Santuchi, M., Dutra, M. F., Vago, J. P., Lima, K. M., Galvao, I., de Souza-Neto, F. P., Morais, E. S. M., Oliveira, A. C., de Oliveira, F. C. B., Goncalves, R., Teixeira, M. M., Sousa, L. P., Dos Santos, R. A. S., & da Silva, R. F. 2019b. Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages In Vitro and In Vivo. *Mediators Inflamm*, 2019: 2401081.
- de Groot, J. C., Ten Brinke, A., & Bel, E. H. 2015. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. *ERJ Open Res*, 1(1).
- de Souza-Neto, F. P., Carvalho Santuchi, M., de Morais, E. S. M., Campagnole-Santos, M. J., & da Silva, R. F. 2018. Angiotensin-(1-7) and Alamandine on Experimental Models of Hypertension and Atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep*, 20(2): 17.
- de Souza-Neto, F. P., Silva, M. M. E., Santuchi, M. C., de Alcantara-Leonidio, T. C., Motta-Santos, D., Oliveira, A. C., Melo, M. B., Canta, G. N., de Souza, L. E., Irigoyen, M. C. C., Campagnole-Santos, M. J., Guatimosim, S., Santos, R. A. S., & da Silva, R. F. 2019. Alamandine attenuates arterial remodelling induced by transverse aortic constriction in mice. *Clin Sci (Lond)*, 133(5): 629-643.
- Dong, X., Han, S., Zylka, M. J., Simon, M. I., & Anderson, D. J. 2001. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*, 106(5): 619-632.
- El-Hashim, A. Z., Khajah, M. A., Babyson, R. S., Renno, W. M., Ezeamuzie, C. I., Benter, I. F., & Akhtar, S. 2019. Ang-(1-7)/ MAS1 receptor axis inhibits allergic airway inflammation via blockade of Src-mediated EGFR transactivation in a murine model of asthma. *PLoS One*, 14(11): e0224163.

- El-Hashim, A. Z., Renno, W. M., Raghupathy, R., Abduo, H. T., Akhtar, S., & Benter, I. F. 2012. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF- κ B-dependent pathways. *Br J Pharmacol*, 166(6): 1964-1976.
- Erpenbeck, V. J., Hagenberg, A., Krentel, H., Discher, M., Braun, A., Hohlfeld, J. M., & Krug, N. 2006. Regulation of GATA-3, c-maf and T-bet mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells and bronchial biopsies after segmental allergen challenge. *Int Arch Allergy Immunol*, 139(4): 306-316.
- Firszt, R., Francisco, D., Church, T. D., Thomas, J. M., Ingram, J. L., & Kraft, M. 2014. Interleukin-13 induces collagen type-1 expression through matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor-beta1 in airway fibroblasts in asthma. *Eur Respir J*, 43(2): 464-473.
- Fulkerson, P. C., & Rothenberg, M. E. 2013. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov*, 12(2): 117-129.
- Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203): 445-454.
- Galvão et al. 2019. Angiotensin 1-7 and Inflammation. Angiotensin-(1-7): A Comprehensive Review.
- Garn, H., & Renz, H. 2017. GATA-3-specific DNase - A novel approach for stratified asthma therapy. *Eur J Immunol*, 47(1): 22-30.
- Global Initiative for Asthma. 2020.
- Gonzalo, J. A., Lloyd, C. M., Kremer, L., Finger, E., Martinez, A. C., Siegelman, M. H., Cybulsky, M., & Gutierrez-Ramos, J. C. 1996. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest*, 98(10): 2332-2345.
- Gonzalo, J. A., Lloyd, C. M., Wen, D., Albar, J. P., Wells, T. N., Proudfoot, A., Martinez, A. C., Dorf, M., Bjerke, T., Coyle, A. J., & Gutierrez-Ramos, J. C. 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med*, 188(1): 157-167.
- Gould, H. J., & Sutton, B. J. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 8(3): 205-217.
- Gour, N., & Wills-Karp, M. 2015. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine*, 75(1): 68-78.
- Guimaraes, P. S., Santiago, N. M., Xavier, C. H., Velloso, E. P., Fontes, M. A., Santos, R. A., & Campagnole-Santos, M. J. 2012. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(3): H393-400.
- Gunn, M. D., Nelken, N. A., Liao, X., & Williams, L. T. 1997. Monocyte chemoattractant protein-1 is sufficient for the chemotaxis of monocytes and lymphocytes in transgenic mice but requires an additional stimulus for inflammatory activation. *J Immunol*, 158(1): 376-383.

- Habiyakare, B., Alsaadon, H., Mathai, M. L., Hayes, A., & Zulli, A. 2014. Reduction of angiotensin A and alamandine vasoactivity in the rabbit model of atherogenesis: differential effects of alamandine and Ang(1-7). *Int J Exp Pathol*, 95(4): 290-295.
- Håkansson, L., Björnsson, E., Janson, C., & Schmekel, B. 1995. Increased adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 of eosinophils from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 96(6 Pt 1): 941-950.
- Holgate, S. T. 2011. Asthma: a simple concept but in reality a complex disease. *Eur J Clin Invest*, 41(12): 1339-1352.
- Holgate, S. T., & Polosa, R. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 8(3): 218-230.
- Holgate, S. T., Wenzel, S., Postma, D. S., Weiss, S. T., Renz, H., & Sly, P. D. 2015a. Asthma. *Nat Rev Dis Primers*, 1(1): 15025.
- Humbert, M., Taillé, C., Mala, L., Le Gros, V., Just, J., & Molimard, M. 2018. Omalizumab effectiveness in patients with severe allergic asthma according to blood eosinophil count: the STELLAIR study. *Eur Respir J*, 51(5).
- Jesus, I. C. G., Scalzo, S., Alves, F., Marques, K., Rocha-Resende, C., Bader, M., & Santos, R. A. S. 2018. Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against ANG II hypertrophy in cardiomyocytes. *314(6): C702-c711*.
- Jose, P. J., Griffiths-Johnson, D. A., Collins, P. D., Walsh, D. T., Moqbel, R., Totty, N. F., Truong, O., Hsuan, J. J., & Williams, T. J. 1994. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*, 179(3): 881-887.
- Kampen, G. T., Stafford, S., Adachi, T., Jinquan, T., Quan, S., Grant, J. A., Skov, P. S., Poulsen, L. K., & Alam, R. 2000. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood*, 95(6): 1911-1917.
- Kay, A. B. 2005. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*, 11(4): 148-152.
- Komai, M., Tanaka, H., Masuda, T., Nagao, K., Ishizaki, M., Sawada, M., & Nagai, H. 2003. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol*, 138(5): 912-920.
- Kudo, M., Ishigatsubo, Y., & Aoki, I. 2013. Pathology of asthma. *Frontiers in Microbiology*, 4(263).
- Kupryś-Lipińska, I., Molińska, K., & Kuna, P. 2016. The effect of omalizumab on eosinophilic inflammation of the respiratory tract in patients with allergic asthma. *Pneumonol Alergol Pol*, 84(4): 232-243.
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. 2015. The immunology of asthma. *Nat Immunol*, 16(1): 45-56.

- Lautner, R. Q., Villela, D. C., Fraga-Silva, R. A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., Soares, E., Barbosa, C., Kjeldsen, F., Oliveira, A., Braga, J., Savergnini, S., Maia, G., Peluso, A. B., Passos-Silva, D., Ferreira, A., Alves, F., Martins, A., Raizada, M., Paula, R., Motta-Santos, D., Klempin, F., Pimenta, A., Alenina, N., Sinisterra, R., Bader, M., Campagnole-Santos, M. J., & Santos, R. A. 2013. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res*, 112(8): 1104-1111.
- Li, P., Chen, X. R., Xu, F., Liu, C., Li, C., Liu, H., Wang, H., Sun, W., Sheng, Y. H., & Kong, X. Q. 2018. Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways. *Life Sci*, 206: 106-116.
- Licari, A., Marseglia, G., Castagnoli, R., Marseglia, A., & Ciprandi, G. 2015. The discovery and development of omalizumab for the treatment of asthma. *Expert Opin Drug Discov*, 10(9): 1033-1042.
- Lin, T. Y., Venkatesan, N., Nishioka, M., Kyoh, S., Al-Alwan, L., Bagloli, C. J., Eidelman, D. H., Ludwig, M. S., & Hamid, Q. 2014. Monocyte-derived fibrocytes induce an inflammatory phenotype in airway smooth muscle cells. *Clin Exp Allergy*, 44(11): 1347-1360.
- Liu, C., Yang, C. X., Chen, X. R., Liu, B. X., Li, Y., Wang, X. Z., Sun, W., Li, P., & Kong, X. Q. 2018. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Amino Acids*, 50(8): 1071-1081.
- Magalhaes, G. S., Barroso, L. C., Reis, A. C., Rodrigues-Machado, M. G., Gregorio, J. F., Motta-Santos, D., Oliveira, A. C., Perez, D. A., Barcelos, L. S., Teixeira, M. M., Santos, R. A. S., Pinho, V., & Campagnole-Santos, M. J. 2018. Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma. *Front Immunol*, 9: 58.
- Magalhães, G. S., Gregório, J. F., Ramos, K. E., Cançado-Ribeiro, A. T. P., Baroni, I. F., Barcelos, L. S., Pinho, V., Teixeira, M. M., Santos, R. A. S., Rodrigues-Machado, M. G., & Campagnole-Santos, M. J. 2020. Treatment with inhaled formulation of angiotensin-(1-7) reverses inflammation and pulmonary remodeling in a model of chronic asthma. *Immunobiology*, 225(3): 151957.
- Magalhaes, G. S., Rodrigues-Machado, M. G., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., Santos, R. A., Barcelos, L. S., & Campagnole-Santos, M. J. 2016b. Chronic allergic pulmonary inflammation is aggravated in angiotensin-(1-7) Mas receptor knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 311(6): L1141-L1148.
- Magalhaes, G. S., Rodrigues-Machado, M. G., Motta-Santos, D., Silva, A. R., Caliari, M. V., Prata, L. O., Abreu, S. C., Rocco, P. R., Barcelos, L. S., Santos, R. A., & Campagnole-Santos, M. J. 2015. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *Br J Pharmacol*, 172(9): 2330-2342.
- Marques, F. D., Ferreira, A. J., Sinisterra, R. D., Jacoby, B. A., Sousa, F. B., Caliari, M. V., Silva, G. A., Melo, M. B., Nadu, A. P., Souza, L. E., Irigoyen, M. C., Almeida, A. P., & Santos, R. A. 2011. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. *Hypertension*, 57(3): 477-483.

- Millar, E. A., Angus, R. M., Hulks, G., Morton, J. J., Connell, J. M., & Thomson, N. C. 1994. Activity of the renin-angiotensin system in acute severe asthma and the effect of angiotensin II on lung function. *Thorax*, 49(5): 492-495.
- Millar, E. A., Nally, J. E., & Thomson, N. C. 1995. Angiotensin II potentiates methacholine-induced bronchoconstriction in human airway both in vitro and in vivo. *Eur Respir J*, 8(11): 1838-1841.
- Muñoz, L. E., Berens, C., Lauber, K., Gaip, U. S., & Herrmann, M. 2015. Apoptotic cell clearance and its role in the origin and resolution of chronic inflammation. *Front Immunol*, 6: 139.
- Myou, S., Fujimura, M., Kamio, Y., Ishiura, Y., Kurashima, K., Tachibana, H., Hirose, T., & Hashimoto, T. 2000. Effect of losartan, a type 1 angiotensin II receptor antagonist, on bronchial hyperresponsiveness to methacholine in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 162(1): 40-44.
- Nakamura, Y., Ghaffar, O., Olivenstein, R., Taha, R. A., Soussi-Gounni, A., Zhang, D. H., Ray, A., & Hamid, Q. 1999. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 103(2 Pt 1): 215-222.
- Noval Rivas, M., & Chatila, T. A. 2016. Regulatory T cells in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 138(3): 639-652.
- Oliveira, A. C., Melo, M. B., Motta-Santos, D., Peluso, A. A., Souza-Neto, F., da Silva, R. F., Almeida, J. F. Q., Canta, G., Reis, A. M., Goncalves, G., Cerri, G., Coutinho, D., Guedes de Jesus, I. C., Guatimosim, S., Linhares, N. D., Alenina, N., Bader, M., Campagnole-Santos, M. J., & Santos, R. A. S. 2019. Genetic deletion of the alamandine receptor MRGD leads to dilated cardiomyopathy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 316(1): H123-H133.
- Ortega, H., Yancey, S. W., Keene, O. N., Gunsoy, N. B., Albers, F. C., & Howarth, P. H. 2018. Asthma Exacerbations Associated with Lung Function Decline in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 6(3): 980-986.e981.
- Palframan, R. T., Collins, P. D., Williams, T. J., & Rankin, S. M. 1998. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood*, 91(7): 2240-2248.
- Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S. E., & Reddel, H. K. 2018. Asthma. *Lancet*, 391(10122): 783-800.
- Pascual, R. M., & Peters, S. P. 2005. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol*, 116(3): 477-486; quiz 487.
- Paul, M., Poyan Mehr, A., & Kreutz, R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, 86(3): 747-803.
- Paul, W. E., & Zhu, J. 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*, 10(4): 225-235.
- Pelaia, C., Calabrese, C., Terracciano, R., de Blasio, F., Vatrella, A., & Pelaia, G. 2018. Omalizumab, the first available antibody for biological treatment of severe asthma: more than a decade of real-life effectiveness. 12: 1753466618810192.

- Pelaia, G., Vatrella, A., & Maselli, R. 2012. The potential of biologics for the treatment of asthma. *Nat Rev Drug Discov*, 11(12): 958-972.
- Qaradakh, T., Matsoukas, M. T., Hayes, A., Rybalka, E., Caprnda, M., Rimarova, K., Sepsi, M., Busselberg, D., Kruzliak, P., Matsoukas, J., Apostolopoulos, V., & Zulli, A. 2017. Alamandine reverses hyperhomocysteinemia-induced vascular dysfunction via PKA-dependent mechanisms. *Cardiovasc Ther*, 35(6).
- Ray, A., & Cohn, L. 1999. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest*, 104(8): 985-993.
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R., & Kay, A. B. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 326(5): 298-304.
- Rodrigues-Machado, M. G., Magalhaes, G. S., Cardoso, J. A., Kangussu, L. M., Murari, A., Caliar, M. V., Oliveira, M. L., Cara, D. C., Noviello, M. L., Marques, F. D., Pereira, J. M., Lautner, R. Q., Santos, R. A., & Campagnole-Santos, M. J. 2013. AVE 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma. *Br J Pharmacol*, 170(4): 835-846.
- Russell, R. J., & Brightling, C. 2017. Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clin Sci (Lond)*, 131(14): 1723-1735.
- Sakai, H., Nishizawa, Y., Nishimura, A., Chiba, Y., Goto, K., Hanazaki, M., & Misawa, M. 2010. Angiotensin II induces hyperresponsiveness of bronchial smooth muscle via an activation of p42/44 ERK in rats. *Pflugers Arch*, 460(3): 645-655.
- Santos, C. F., Santos, S. H., Ferreira, A. V., Botion, L. M., Santos, R. A., & Campagnole-Santos, M. J. 2013. Association of an oral formulation of angiotensin-(1-7) with atenolol improves lipid metabolism in hypertensive rats. *Peptides*, 43: 155-159.
- Santos, R. A. 2014. Angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 63(6): 1138-1147.
- Santos, R. A., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., & Walther, T. 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14): 8258-8263.
- Santos, R. A. S., Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., & Campagnole-Santos, M. J. 2018b. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*, 98(1): 505-553.
- Schuliga, M. 2015. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. *Biomolecules*, 5(3): 1266-1283.

- Shenoy, V., Kwon, K. C., Rathinasabapathy, A., Lin, S., Jin, G., Song, C., Shil, P., Nair, A., Qi, Y., Li, Q., Francis, J., Katovich, M. J., Daniell, H., & Raizada, M. K. 2014. Oral delivery of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-(1-7) bioencapsulated in plant cells attenuates pulmonary hypertension. *Hypertension*, 64(6): 1248-1259.
- Soltani Hekmat, A., Javanmardi, K., Kouhpayeh, A., Baharamali, E., & Farjam, M. 2017. Differences in Cardiovascular Responses to Alamandine in Two-Kidney, One Clip Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ J*, 81(3): 405-412.
- Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., & Teixeira, M. M. 2016. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol*, 7: 160.
- Sukumaran, V., Veeraveedu, P. T., Gurusamy, N., Lakshmanan, A. P., Yamaguchi, K., Ma, M., Suzuki, K., Kodama, M., & Watanabe, K. 2012. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sci*, 90(7-8): 289-300.
- Sukumaran, V., Veeraveedu, P. T., Gurusamy, N., Yamaguchi, K., Lakshmanan, A. P., Ma, M., Suzuki, K., Kodama, M., & Watanabe, K. 2011. Cardioprotective effects of telmisartan against heart failure in rats induced by experimental autoimmune myocarditis through the modulation of angiotensin-converting enzyme-2/angiotensin 1-7/mas receptor axis. *Int J Biol Sci*, 7(8): 1077-1092.
- Taís Salvi, S., Robson Augusto Souza, d. S., & Katya, R. 2019. The Renin-Angiotensin System: Alamandine is reduced in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Journal of Cardiology and Cardiovascular Medicine*, 4(3): 210-215.
- Tan, W. S. D., Liao, W., Zhou, S., Mei, D., & Wong, W. F. 2018. Targeting the renin-angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 40: 9-17.
- Tavakkol Afshari, J., Farid Hosseini, R., Hosseini Farahabadi, S., Heydarian, F., Boskabady, M. H., Khoshnavaz, R., Razavi, A., Ghayoor Karimiani, E., & Ghasemi, G. 2007. Association of the expression of IL-4 and IL-13 genes, IL-4 and IgE serum levels with allergic asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 6(2): 67-72.
- Tran, T. N., Khattry, D. B., Ke, X., Ward, C. K., & Gossage, D. 2014. High blood eosinophil count is associated with more frequent asthma attacks in asthma patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 113(1): 19-24.
- Wang, L., Liu, C., Chen, X., & Li, P. 2019. Alamandine attenuates longterm hypertensioninduced cardiac fibrosis independent of blood pressure. *Mol Med Rep*, 19(6): 4553-4560.
- Williams, T. J. 2015. Eotaxin-1 (CCL11). *Front Immunol*, 6: 84.
- Wong, C. K., Wang, C. B., Li, M. L., Ip, W. K., Tian, Y. P., & Lam, C. W. 2006. Induction of adhesion molecules upon the interaction between eosinophils and bronchial epithelial cells: involvement of p38 MAPK and NF-kappaB. *Int Immunopharmacol*, 6(12): 1859-1871.
- Wynn, T. A. 2015. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nat Rev Immunol*, 15(5): 271-282.

- Xisto, D. G., Farias, L. L., Ferreira, H. C., Picanço, M. R., Amitrano, D., Lapa, E. S. J. R., Negri, E. M., Mauad, T., Carnielli, D., Silva, L. F., Capelozzi, V. L., Faffe, D. S., Zin, W. A., & Rocco, P. R. 2005. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 171(8): 829-837.
- Yang, L., Cohn, L., Zhang, D. H., Homer, R., Ray, A., & Ray, P. 1998. Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J Exp Med*, 188(9): 1739-1750.
- Zhou, C., Li, J., Liu, L., Tang, Z., Wan, F., & Lan, L. 2019. Expression and localization of MrgprD in mouse intestinal tract. *Cell Tissue Res*, 377(2): 259-268.
- Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C. J., Grinberg, A., Wang, Q., Killeen, N., Urban, J. F., Jr., Guo, L., & Paul, W. E. 2004. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol*, 5(11): 1157-1165.
- Zhu, P., Verma, A., Prasad, T., & Li, Q. 2020. Expression and Function of Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D and Its Ligand Alamandine in Retina. *Mol Neurobiol*, 57(1): 513-527.
- Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., Tang, D., & Chen, R. 2018. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*, 8(3).