

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

MELISSA DE CARVALHO SANTUCHI

EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) E ALAMANDINA NA POLARIZAÇÃO *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS MURÍNICOS PARA OS FENÓTIPOS M1 E M2A.

ORIENTADORA: PROFa. DRA. RAFAELA FERNANDES DA SILVA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS

Belo Horizonte

2017

MELISSA DE CARVALHO SANTUCHI

EFEITOS DA ANGIOTENSINA-(1-7) E ALAMANDINA NA POLARIZAÇÃO *IN VITRO*
DE MACRÓFAGOS MURÍNICOS PARA OS FENÓTIPOS M1 E M2A.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia e Farmacologia como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre,
área de concentração em Fisiologia.

ORIENTADORA: PROFa. DRA. A RAFAELA FERNANDES DA SILVA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS

Belo Horizonte

2017

AGRADECIMENTOS

Foram dois anos de mestrado; e, mais que isso, dois anos de aprendizado e de constante busca pelo conhecimento. Trabalhar com macrófagos é, no mínimo, surpreendente e o final foi gratificante.

Nesse processo, houve pessoas sem as quais todo esse conhecimento não poderia ser construído e lapidado. Meus sinceros agradecimentos e respeito aos Professores Dra. Rafaela Fernandes da Silva, minha orientadora, e Dr. Robson Augusto Souza Santos - meu co-orientador -, pela oportunidade de vivenciar uma experiência acadêmica e em pesquisa científica muito ricas e, assim, desenvolver este trabalho, compartilhando comigo tantos conhecimentos. À Miriane, aluna de iniciação científica que me acompanhou desde o início do Mestrado, agradeço por toda a ajuda nos experimentos, pela companhia e pela amizade. Aos meus colegas do Laboratório de Hipertensão, principalmente, Danielle Gomes, Daisy Motta, Marilene, Aline Oliveira e Onésia, por toda a ajuda desde a época de iniciação científica. Parte de meu conhecimento técnico vem de vocês e sou grata por terem sempre estado à disposição para tirar dúvidas! À Professora Maria Aparecida Vieira e todos os colegas do Laboratório de Fisiologia Renal “Professor Fernando Alzamora”: André, Leda, Esdras, Roberta, Fernando, Mário e Gabriela, obrigada pelos ótimos momentos que passamos juntos e por me incluírem com carinho na pequena comunidade vocês. Ao Professor Dr. Ricardo Gonçalves e seus alunos de Doutorado Flávia e Gregório, do Laboratório de Patologia de Leishmanioses, pela ajuda com os protocolos de isolamento e cultivo celular e pelo M-CSF utilizado neste trabalho. Às Professoras Dra. Maria de Fátima Leite, Dra. Maristela Polentini e Dra. Adelina Martha dos Reis por cederem um espaço para o cultivo celular. Aos funcionários da Secretaria da PGFisFar, aos técnicos e aos funcionários da limpeza, obrigada pela paciência e colaboração.

Foi essencial também o apoio de minha família e amigos para que a linha de chegada se tornasse visível e alcançável. Mãe e pai, vocês são alvo de toda a minha gratidão e amor por terem sempre me incitado a buscar o “sim” ao invés do “não”. À Karla e Camila, minhas irmãs, sem vocês não existiria o Trio que me deixa tão feliz e amada. Ao Raphael, obrigada pelo amor e por me fazer sempre seguir em frente. Às minhas melhores, Natália, Camila, Nerissa e Flávia, obrigada pela amizade, carinho e compreensão. É sempre um prazer estar com vocês.

Por fim, um último agradecimento – e não menos importante. A todos os animais que utilizei para desenvolver este trabalho, sem os quais isso nunca poderia ter sido realizado. A sua contribuição é inigualável e inestimável.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCT Nanobiofar) pelo subsídio financeiro para a realização do projeto.

RESUMO

Introdução: Macrófagos ativados aos fenótipos M1 e M2a são considerados importantes efetores em diversas condições fisiopatológicas como inflamação e doenças cardiovasculares. A angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] diminui a resposta inflamatória de alguns genes em M1, mas não é sabido seu efeito sobre outras citocinas e sobre o fenótipo M2a. Não existem relatos do efeito da alamandina, componente recém-caracterizado do sistema renina-angiotensina, na polarização de macrófagos. **Objetivo:** Avaliar o efeito da Ang-(1-7) e alamandina no perfil fenotípico de macrófagos M1 e M2a de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos FVB/N *in vitro*. **Métodos:** Células da medula óssea obtidas de fêmures e tíbias de camundongos machos FVB/N WT adultos foram cultivadas por 8 dias. Foi feita a polarização *in vitro* a M1 (IFN- γ e LPS) e M2 (IL-4) por 4 horas, seguida de tratamento com veículo, Ang-(1-7) ou alamandina, ambas a 10^{-7} M, em cada um dos grupos. A caracterização de M1 e M2a foi feita pela marcação de F-actina e pela expressão de dos transcritos de Arg-2, CCL2, IL-1 β , IL-10, iNOS e TNF α (M1); e Arg-1, CD206, FIZZ-1, IL-10 e YM-1(M2a) por qPCR. Foram analisados o conteúdo de TNF α (ELISA) e NO $_2^-$ (método de Griess); e a produção de EROs por DHE. Foi avaliada também a expressão e localização dos receptores Mas e MrgD em ambos os fenótipos por qPCR e imunofluorescência. Os efeitos dos peptídeos foram avaliados por qPCR e a participação dos receptores Mas e MrgD nestes foi analisada pelo antagonismo farmacológico por A779 e D-Pro. **Resultados:** Não foram observadas diferenças morfológicas entre os fenótipos M1 e M2a. Os tratamentos com Ang-(1-7) e alamandina diminuíram a expressão dos genes para M1 (TNF α , IL-1 β e CCL2). Em M2a, a expressão de FIZZ-1 não foi alterada, mas se observou aumento da expressão do transcrito para YM-1 com o tratamento com os dois peptídeos. A alamandina ainda reduziu a expressão do transcrito de CD206. O antagonismo farmacológico dos receptores com A779 e D-Pro revelou que os efeitos observados em M1 são dependentes dos receptores Mas e MrgD, respectivamente, exceto para IL-1 β . Em M2a, o efeito observado não parece depender desses receptores. **Conclusão:** Com marcadores previamente descritos na literatura, M1 e M2a foram caracterizados e demonstrou-se que ambas Ang-(1-7) e alamandina afetam distintamente a polarização dessas células, diminuindo a expressão de um conjunto de genes pró-inflamatórios e agindo em um espectro menor nos genes anti-inflamatórios. Este é o primeiro relato da presença do receptor MrgD em macrófagos murínicos e do efeito anti-inflamatório da ativação da via alamandina/MrgD. **Apoio financeiro:** CAPES, CNPq, FAPEMIG e INCT Nanobiofar.

Palavras-chaves: macrófagos, caracterização fenotípica, fenótipos M1 e M2a, citocinas, sistema renina-angiotensina, angiotensina-(1-7), alamandina, receptor Mas, MrgD.

ABSTRACT

Background: Macrophages activated to M1 and M2a phenotypes are considered important effectors in several pathophysiological conditions such as inflammation and cardiovascular diseases. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] decreases the inflammatory response of some genes in M1, but its effect on other cytokines and on the M2a phenotype is not known. There are no reports of the effect of alamandine, a newly characterized component of the renin-angiotensin system, on macrophage polarization. **Aim:** To evaluate the effect of Ang-(1-7) and alamandine on the phenotypic profile of macrophages M1 and M2a from bone marrow-derived macrophages of FVB/N mice *in vitro*. **Methods:** Bone marrow cells obtained from femurs and tibias of adult WT FVB/N mice were cultured for 8 days. *In vitro* polarization was performed in M1 (IFN- γ and LPS) and M2 (IL-4) during 4 hours, followed by vehicle, Ang-(1-7) or alamandine treatments, with both peptides at 10^{-7} M in each group. M1 and M2a were characterized by F-actin labeling and the expression of Arg-2, CCL2, IL-1 β , IL-10, iNOS and TNF α (M1); And Arg-1, CD206, FIZZ-1, IL-10 and YM-1 (M2a) transcripts by qPCR. The contents of TNF α (ELISA) and NO $_2^-$ (Griess method) were analyzed; and the production of EROs by DHE. The expression and localization of Mas and MrgD receptors in both phenotypes were also evaluated by qPCR and immunofluorescence. The effects of the peptides were assessed by qPCR and the role of the Mas and MrgD receptors in these was analyzed by the pharmacological antagonism using A779 and D-Pro. **Results:** No morphological differences were observed between M1 and M2a phenotypes. Treatments with Ang-(1-7) and alamandine decreased gene expression for M1 (TNF α , IL-1 β and CCL2). In M2a, the expression of FIZZ-1 was not altered, but increased expression of the YM-1 transcript was observed with the treatment with the two peptides. Alamandine further reduced the expression of the CD206 transcript. Pharmacological antagonism of Mas and MrgD by A779 and D-Pro revealed that the effects observed on M1 are dependent on these receptors, respectively, except for IL-1 β . In M2a, the observed effect does not seem to depend on these receptors. **Conclusion:** Using markers previously described in the literature, M1 and M2a have been characterized and it has been shown that both Ang-(1-7) and alamandine distinctly affect the polarization of these cells, decreasing the expression of a set of proinflammatory genes and acting in a smaller spectrum in the anti-inflammatory genes. This is the first report of the presence of the MrgD receptor in murine macrophages and the anti-inflammatory effect of the activation of the alamandine/MrgD pathway. **Financial support:** CAPES, CNPq, FAPEMIG and INCT Nanobiofar.

Keywords: macrophages, phenotypic characterization, M1 and M2a phenotypes, cytokines, renin angiotensin-system, angiotensin-(1-7), alamandine, Mas receptor, MrgD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema simplificado do sistema renina-angiotensina (SRA).

Figura 2: Esquema da metodologia adotada no presente trabalho.

Figura 3: Análise da morfologia celular de M ϕ MO por meio de marcação de F-actina por faloidina.

Figura 4: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M1.

Figura 5: Concentração de TNF α em pg/mL no sobrenadante de cultura de M ϕ MO dos grupos não estimulado e polarizado aos fenótipos M1 e M2a.

Figura 6: Formação de EROs por meio de fluorescência de DHE em M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a.

Figura 7: Concentração de NO $_2^-$ em M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a.

Figura 8: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M2a.

Figura 9: Expressão de RNAm dos genes para os receptores Mas e MrgD nos fenótipos M1 e M2a.

Figura 10: Expressão do receptor Mas em M ϕ MO não estimulados e polarizados aos fenótipos M1 e M2a.

Figura 11: Expressão do receptor MrgD em M ϕ MO não estimulados e polarizados aos fenótipos M1 e M2a.

Figura 12: Efeito de diferentes concentrações de Ang-(1-7) em M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a.

Figura 13: Efeito de diferentes concentrações de alamandina em M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a.

Figura 14: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M1 após o tratamento com Ang-(1-7) a 10^{-7} M.

Figura 15: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M2a após o tratamento com Ang-(1-7) a 10^{-7} M.

Figura 16: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M1 após o tratamento com alamandina a 10^{-7} M.

Figura 17: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M2a após o tratamento com alamandina a 10^{-7} M.

Figura 18: Efeito do antagonismo do receptor Mas com A779 (10^{-6} M) previamente ao tratamento com Ang-(1-7) a 10^{-7} M na expressão de marcadores para os fenótipos M1 e M2a.

Figura 19: Efeito do antagonismo do receptor MrgD com D-Pro (10^{-6} M) previamente ao tratamento com alamandina a 10^{-7} M na expressão de marcadores para os fenótipos M1 e M2a.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A779 – (D-Ala⁷)-Angiotensina I/II (1-7)

AC – Adenilil ciclase

AMPC – AMP cíclico (em inglês, *cyclic adenosine monophosphate*, monofosfato de adenosina cíclico)

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

ApoE^{-/-} – Deleção para o gene codificador da apolipoproteína E

Arg1 – Arginase-1

Arg2 – Arginase-2

AT1 – Receptor de angiotensina do tipo 1

AT2 – Receptor de angiotensina do tipo 2

BSA – Albumina sérica bovina (em inglês, *bovine seric albumin*)

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCL2 – Quimiocina motivo (C-C) ligante 2 (CCL2)

CD14 – Grupo de diferenciação 14 (em inglês, *cluster of differentiation 14*)

CD206 – Receptor de manose 1 (em inglês, *cluster of differentiation 206*)

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (em inglês, *complementary desoxiribonucleic acid*)

C/EBP β – Proteína ligadora de potenciador/CCAAT β (em inglês, *CCAAT/enhancer-binding protein β*)

CEUA – Comissão de Ética no Uso dos Animais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CREB – Proteína ligadora de elemento responsivo ao AMP cíclico (em inglês, *cAMP-responsive elemento-binding protein*)

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

$\Delta\Delta C_t$ – Método do C_t comparativo “delta-delta C_t ”

DHE - Di-hidroetídio

D-Pro – D-Pro⁷-angiotensina-(1-7)

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ECA2 – Enzima conversora de angiotensina 2

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

FIZZ-1 – Proteína encontrada na zona inflamatória 1 (em inglês, *found in inflammatory zone 1*)

GABA - ácido gama-aminobutírico (em inglês, *gamma-aminobutyric acid*)

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

IC – Imunocomplexo

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFN- γ – Interferon- γ

IL-1 – Interleucina-1

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12

IL-13 – Interleucina-13

INCT Nanobiofar – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível (em inglês, *inducible nitric oxide synthase*)

JAK-STAT – Proteína quinase Janus transdutora de sinais e ativadora de transcrição (em inglês, *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*)

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno (em inglês, *mitogen-activated protein kinase*)

MφMO – Macrófagos derivados de medula óssea

M-CSF – Fator estimulante de colônias de macrófagos (em inglês: *macrophage colony-stimulating factor*)

MyD88 – Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (em inglês, *myeloid differentiation primary response protein 88*)

MrgD – Receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas, membro D (em inglês, *Mas-related G protein-coupled receptor, member D*)

NF-κB – Fator nuclear κ B (em inglês, *nuclear factor κ B*)

NO – Óxido nítrico (em inglês, *nitric oxide*)

NO₂⁻ – Íon nitrito

NOS – Óxido nítrico sintase (em inglês, *nitric oxide synthase*)

n.s. – Não significativo

pH – Potencial hidrogeniônico

PI3K – fosfatidilinositol quinase-3 (em inglês, *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase*)

PFA – Paraformaldeído

qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (em inglês, *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

RNA – Ácido ribonucleico (em inglês, *ribonucleic acid*)

RNAm – RNA mensageiro

RT-PCR – Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa (em inglês: *reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

SFB – Soro fetal bovino

SSF – Solução Salina Fosfatada

SRA – Sistema renina-angiotensina

STAT – Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição (em inglês, *signal transducer and activator of transcription*)

TLR – Receptor do tipo *Toll* (em inglês, *Toll-like receptor*)

TRIF – Proteína de domínio TIR contendo adaptador de indução de interferon β (em inglês, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon β*)

TNF α – Fator de necrose tumoral- α (em inglês, *tumor necrosis factor- α*)

U.A. – Unidade arbitrária

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

YM-1 - Proteína ligadora de lectina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

g – Força gravitacional

Kg – Quilograma

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

μm^2 – Micrômetro ao quadrado (área)

μM - Micromolar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

M – Concentração molar

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

pg – Picograma

% – Porcentagem

rpm – Rotações por minuto

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	Macrófagos: origens e respostas de ativação.....	16
1.2	Sistema renina-angiotensina	18
1.3	O SRA e o papel fisiopatológico de macrófagos.....	22
2.	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Animais	26
3.2	Isolamento e cultivo de macrófagos derivados da medula óssea (M ϕ MO).....	26
3.3	Polarização <i>in vitro</i> de M ϕ MO aos fenótipos M1 e M2a.....	27
3.4	PARTE 1: Caracterização de MϕMO polarizados aos fenótipos M1 e M2a	27
3.4.1	Análise da morfologia celular de macrófagos por faloidina	28
3.4.2	Da extração do RNA total à reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)	28
3.4.3	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para TNF α	29
3.4.4	Análise do conteúdo de nitrito (NO $_2^-$) pelo método de Griess.....	29
3.4.5	Análise da formação de EROs.....	30
3.4.6	Imunofluorescência para os receptores Mas e MrgD.....	30
3.5	PARTE 2: Diagrama de concentração-resposta para os peptídeos Ang-(1-7) e alamandina	31
3.6	PARTE 3: Tratamento de MϕMO com Ang-(1-7) e alamandina a 10$^{-7}$M durante polarização <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a.....	31
3.7	PARTE 4: Antagonismo farmacológico dos receptores Mas e MrgD em MϕMO dos fenótipos M1 e M2a.....	32
3.8	Análises estatísticas.....	32
4.	RESULTADOS.....	34

4.1	PARTE 1: Caracterização de MφMO polarizados <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a	34
4.1.1	Análise da morfologia celular por meio de faloidina	34
4.1.2	Expressão do RNAm de genes marcadores em MφMO polarizados <i>in vitro</i> ao fenótipo M1	36
4.1.3	Análise da expressão da citocina TNFα por ELISA em MφMO polarizados <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a	37
4.1.4	Análise da formação de EROs por fluorescência de DHE em MφMO polarizados <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a	37
4.1.5	Análise da concentração de NO ₂ ⁻ pelo método de Griess em MφMO polarizados <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a	39
4.1.6	Expressão do RNAm de genes marcadores em MφMO polarizados <i>in vitro</i> ao fenótipo M2a	39
4.1.7	Receptores Mas e MrgD em MφMO polarizados <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a	40
4.1.7.1	Expressão de RNAm dos genes para os receptores Mas e MrgD	40
4.1.7.2	Imunofluorescência para os receptores Mas e MrgD.....	41
4.2	PARTE 2: Efeito do tratamento de Ang-(1-7) e alamandina em diferentes concentrações sobre a expressão de genes característicos dos fenótipos M1 e M2a	43
4.3	PARTE 3: Efeitos da Ang-(1-7) e alamandina a 10⁻⁷M sobre MφMO polarizados <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a.....	45
4.3.1	Efeito do tratamento de Ang-(1-7) a 10 ⁻⁷ M sobre MφMO polarizados <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a	45
4.3.2	Efeito do tratamento de alamandina a 10 ⁻⁷ M sobre MφMO polarizados <i>in vitro</i> aos fenótipos M1 e M2a.....	47
4.4	PARTE 4: Participação dos receptores Mas e MrgD nos efeitos da Ang-(1-7) e alamandina a 10⁻⁷M sobre MφMO polarizados aos fenótipos M1 e M2a	49
5.	DISCUSSÃO	53
6.	CONCLUSÃO	61
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO I.....		70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Macrófagos: origens e respostas de ativação

Macrófagos são fagócitos mononucleares que estão amplamente distribuídos em todos os tecidos (GORDON; TAYLOR, 2005) e, atualmente, são um dos principais componentes do sistema fagocítico mononuclear, originalmente proposto por van Furth et al. (1972), que engloba células derivadas da medula óssea responsáveis pela apresentação de antígenos, fagocitose e secreção de citocinas (AUFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). Os macrófagos, portanto, participam de uma ampla gama de processos biológicos, desde o combate às infecções (CHANG et al., 2001) até o reparo tecidual (BEN-MORDECHAI et al., 2013), possuindo, assim, um importante papel na manutenção da homeostasia dos tecidos (GORDON; TAYLOR, 2005).

Em uma revisão bem fundamentada, Epelman; Lavine; Radolph (2014) relataram o uso de estudos ontogenéticos para mapeamento do destino de diversas linhagens celulares, que permitiram a identificação dos locais de origem de macrófagos em momentos diferentes do ciclo biológico de um organismo. No início do período embrionário, esses fagócitos são formados no saco vitelino (GINHOUX et al., 2010) e, ao final do período gestacional, quando as células-tronco hematopoiéticas se estabelecem na medula óssea vindas do fígado fetal, o restante das linhagens de células do sistema imune é gerado (MÜLLER et al., 1994; GALLOWAY; AZON, 2003). A partir desse ponto, novos macrófagos se diferenciam de monócitos circulantes, os quais se desenvolvem a partir de células progenitoras da linhagem mieloide – que também origina outros granulócitos – na medula óssea (VOLKMAN; GOWANS, 1965; GORDON; TAYLOR, 2005). Além disso, estudos recentes demonstraram a capacidade de repopulação dessas células por mecanismos locais de proliferação dos próprios macrófagos residentes para a manutenção dos números de células existentes no tecido e também durante eventos como processos inflamatórios (MERAD et al., 2002; HASHIMOTO et al., 2013).

Os macrófagos são células altamente responsivas a estímulos provenientes do microambiente em que se encontram e alteram seus perfis de expressão gênica e secreção de produtos e metabólitos celulares durante processos fisiológicos e patológicos, o que tem sido chamado de respostas de ativação ou polarização (MACKANESS, 1962; STEIN et al., 1992; STOUT et al., 2005; MARTINEZ; GORDON, 2014; MURRAY et al., 2014). Nesse sentido, diversos estudos *in vitro* têm buscado uma melhor compreensão sobre o papel e as vias envolvidas na polarização dessas células, atribuindo a elas distintos estados de

ativação, dos quais os fenótipos M1 e M2 representam dois extremos dentro do amplo espectro fenotípico celular existente (MACKANESS, 1962; ADAMS; HAMILTON, 1992; STEIN et al, 1992; MILLS et al, 2000; STOUT et al., 2005; MANTOVANI et al., 2004; EDWARDS et al., 2006; MOSSER; ZHANG, 2008).

Os macrófagos polarizados ao fenótipo M1 (MILLS et al., 2000), antes referidos como "macrófagos classicamente ativados" (MACKANESS, 1962), são células imunes efetoras imprescindíveis para a defesa do hospedeiro contra microrganismos, agindo também na amplificação de respostas inflamatórias (THOMAS ; MCCROSSAN; SELKIRK, 1997; MOSSER; ZHANG, 2008). Nessas células, é bem documentada na literatura a ocorrência da indução da síntese e regulação positiva de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, entre elas, o fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina-12 (IL-12), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β) (MANTOVANI et al., 2004; MOSSER; EDWARDS, 2008; MARTINEZ; GORDON, 2014), bem como uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e intermediários de nitrogênio (MACMICKING; XIE ; NATHAN, 1997). São expressos, ainda, receptores relacionados à opsonização e atividade microbida (MANTOVANI et al., 2004). Na literatura, a polarização ao fenótipo M1 *in vitro* é possível com a utilização de agentes microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas de baixa densidade oxidadas e citocinas de células T-*helper* do tipo 1 (por exemplo, interferon- γ – IFN- γ), incluindo combinação entre eles (MANTOVANI et al., 2004; MING et al., 2012; MOSSER; ZHANG, 2008).

Por outro lado, o fenótipo M2 (MILLS et al., 2000) – também conhecido como "macrófago alternativamente ativado" (STEIN et al. 1992) – participa da resolução das respostas inflamatórias (MING *et al.*, 2012) e possui papel importante em situações envolvendo alergias, infecções parasitárias, remodelamento tecidual e progressão de tumores (ANTHONY et al., 2006; HESSE et al., 2001; GOCHEVA et al., 2010; GORDON; MARTINEZ, 2010). Esse fenótipo pode ser obtido *in vitro* com o uso de estímulos diversos, o que gerou a sua categorização em três subtipos (MANTOVANI et al., 2004): M2a, por interleucina-4 (IL-4), interleucina-13 (IL-13) ou ambas; M2b, por imunocomplexos (IC) e receptores do tipo *Toll* (TLR) ou ligantes do receptor para IL-1; e M2c, por IL-10 e hormônios glicocorticoides. O subtipo M2a é caracterizado pela produção de proteínas como a proteína ligadora de lectina (YM-1) e a encontrada na zona inflamatória 1 (FIZZ-1) (RAES et al, 2002), além da expressão de receptores como o de manose 1 (CD206) (STEIN et al., 1992), *scavenger* e de galactose, e antagonistas do receptor de interleucina-1 (IL-1); e uma regulação negativa de diversas citocinas pró-inflamatórias (MANTOVANI et al., 2004). Já o subtipo M2b, descrito pelo pesquisador David Mosser, devido à utilização de IC associados à ativação de TLRs ou do receptor de IL-1, apresenta uma produção

considerável de citocinas inflamatórias como observado no fenótipo M1, mas também apresentam alta razão de interleucina-10 (IL-10)/IL-12 (MOSSER, 2003; MANTOVANI et al., 2004). Por sua vez, o subtipo M2c, devido à utilização de IL-10, apresenta uma tendência a expressar maiores quantidades de receptores para citocinas pró-inflamatórias, de CD206 e substâncias relacionadas à deposição de matriz extracelular, como o fator de crescimento transformador β (MANTOVANI et al., 2004).

Uma diferença bastante presente na literatura entre os fenótipos M1 e M2 diz respeito ao metabolismo de L-arginina nessas células. Esse aminoácido é substrato para as enzimas arginase e óxido nítrico sintase (NOS), que catalisam a sua biotransformação principalmente em ureia e L-ornitina; e L-citrulina e óxido nítrico (NO), respectivamente (TAPIERO et al., 2002; PERNOW; JUNG, 2013). A arginase existe em duas isoformas – arginase-1 (Arg1) e arginase-2 (Arg2) – que apresentam não apenas localizações diferentes, mas também possuem suas atividades estimuladas por estímulos opostos em macrófagos ativados (PERNOW; JUNG, 2013).

Dadas as diferenças de expressão das diversas citocinas, quimiocinas, receptores e outras proteínas entre os fenótipos M1 e M2, fica claro que a caracterização dos fenótipos *in vitro* pode ser feita por diversas abordagens e é importante para a padronização do modelo experimental utilizado em cada trabalho. Uma delas é a análise da expressão gênica, visto que os macrófagos a alteram frente a diferentes estímulos (HUME, 2015). Além disso, tem-se buscado fazer uma distinção entre os fenótipos polarizados a M1 e M2 no que concerne à morfologia dessas células quando ativadas *in vitro* (PORCHERAY et al. 2005; PELEGRIN; SURPRENANT, 2009). É importante ressaltar que, apesar de os estudos *in vitro* serem realizados em ambientes controlados, a existência de diferentes protocolos de polarização de macrófagos disponíveis no que concerne ao tempo de incubação (RAES et al. 2002; PELEGRIN; SURPRENANT, 2009; MING et al., 2012), à origem das células (ITOU et al., 2006; DAVIS et al., 2013; WANG et al. 2013), à espécie e linhagem animal (GORDON; TAYLOR, 2005) e aos estímulos (RAES et al., 2002; LACEY et al., 2012; HAMILTON et al., 2014) torna a caracterização dessas células bastante variável.

1.2 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) (figura 1) é um conjunto de cascatas que possui um importante papel não apenas na regulação da pressão arterial, mas também do volume extracelular e da perfusão tecidual (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011). A cascata

do chamado SRA clássico inicia-se com a biossíntese dessa enzima pelas células justaglomerulares renais a partir da pré-pro-renina (GRIENGLING; MURPHY; ALEXANDER, 1993). Após clivagens sequenciais, a renina ativa é secretada na circulação sanguínea (NARUSE et al., 1982), clivando o angiotensinogênio proveniente do fígado e formando o decapeptídeo inativo Angiotensina I (Ang I) (GOMEZ, 1990). Este é hidrolisado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), culminando na formação de angiotensina II (Ang II) (CAREY; SIRAGY, 2003; LOVREN et al., 2008), cujos efeitos vasculares, cardíacos, renais e adrenais são mediados por dois receptores acoplados à proteína G (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011). O receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1) está expresso nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos, no coração e também em outros órgãos, como o rim e o cérebro (BADER; GANTEN, 2008). A interação da Ang II com esse receptor é responsável por vasoconstrição, progressão de processos inflamatórios e proliferativos, entre outros efeitos (FERRARIO, 2006). Por sua vez, o receptor de angiotensina do tipo 2 (AT2), que se encontra bastante expresso durante o período embrionário, possui expressão reduzida após o nascimento (CAREY; SIRAGY, 2003; SCHULMAN; RAIJ, 2008). Ele medeia muitos efeitos contrários àqueles do receptor AT1 (CAREY, 2005). Dessa forma, os efeitos fisiológicos principais do SRA clássico recaem sobre o receptor AT1 (FERRARIO, 2006).

A identificação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que antagoniza algumas das ações do eixo Ang II/ECA/AT1 (LOVREN et al., 2008) ao promover a degradação de Ang II para o nonopeptídeo angiotensina-(1-9) e o heptapeptídeo angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (LOVREN et al., 2008; NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011), permitiu a visualização de um novo eixo no SRA (LAUTNER; VILELLA; FRAGA-SILVA et al., 2013; SAMPAIO et al., 2007). A Ang-(1-7) também pode ser sintetizada por outras vias a partir de Ang I ou da própria angiotensina-(1-9) pela ação de endopeptidases (YAMAMOTO et al., 1992) e, uma vez formada, pode ser degradada pela ECA e por aminopeptidases em fragmentos inativos (CHAPPELL et al., 2014; YAMAMOTO et al., 1992). Esse peptídeo está presente na circulação e em tecidos como o cérebro, coração, vasos sanguíneos e outros (SANTOS et al., 2008). De forma contrária à Ang II, a Ang-(1-7) é um potente vasodilatador (FERRARIO et al., 1997; REN; GARVIN; CARRETERO, 2002), possuindo também efeitos antiproliferativos (TALLANT; FERRARIO; GALLAGHER, 2005) e anti-inflamatórios (SOUZA; COSTA-NETO, 2012). Esses efeitos são mediados pelo receptor Mas acoplado à proteína G, do qual esse heptapeptídeo é um agonista endógeno (SANTOS et al., 2003), e, juntamente com a ECA2, compõem parte do chamado eixo alternativo do SRA. Em camundongos, esse receptor está expresso em vários tecidos como o cérebro, testículos, coração e pulmões (BADER et al., 2014). No estudo do papel do receptor Mas *in vivo* e *in*

vitro, tem sido de grande valia a utilização de bloqueadores farmacológicos, como o (D-Ala⁷)-Angiotensina I/II (1-7) (A779) para a compreensão das vias intracelulares ativadas pela interação Ang-(1-7)-receptor Mas que levam aos efeitos anteriormente citados em diversos modelos experimentais (SOUZA; COSTA-NETO, 2012; VILLALOBOS et al., 2016; CHEN et al., 2017).

Recentemente, Lautner; Vilella; Fraga-Silva et al. (2013) relataram que a Ang-(1-7) pode ser descarboxilada no aminoácido aspartato¹ para alanina¹, gerando um análogo, a Ala-Ang-(1-7) (alamandina), que está presente na circulação sanguínea em humanos e no coração de ratos, e age via o receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas, membro D (MrgD), cujos transcritos já foram relatados em neurônios sensoriais primários e outros tecidos, como o coração, músculos e testículos (ZYLKA et al., 2005; THORREZ et al., 2011; LAUTNER; VILELLA; FRAGA-SILVA et al., 2013;). Esse peptídeo pode ser também sintetizado por meio da clivagem da porção C-terminal do octapeptídeo angiotensina A pela ECA2. Observou-se, ainda, que os efeitos da alamandina são semelhantes aos observados para a Ang-(1-7) via receptor Mas, como a vasodilatação via NO e a modulação da pressão arterial (LAUTNER; VILELLA; FRAGA-SILVA et al., 2013). No entanto, de forma surpreendente, os mesmos autores demonstraram que esses efeitos persistiam em camundongos que não expressavam o receptor Mas, sugerindo que a alamandina não é uma agonista deste receptor (LAUTNER; VILELLA; FRAGA-SILVA et al., 2013; VILLELA; PASSOS-SILVA; SANTOS, 2014). A interação da alamandina-receptor Mas pode não ocorrer, mas Gembardt et al. (2008) já haviam demonstrado que a Ang-(1-7) interage fracamente com o receptor MrgD, gerando a ativação de uma cascata intracelular envolvendo o monofosfato de adenosina cíclico (em inglês, *cyclic adenosine monophosphate*, AMPc) e adenilil ciclase (AC) (TETZNER; GEBOLYS et al., 2016). Com a descoberta recente desses novos componentes do SRA, existem poucos estudos sobre o seu papel em doenças, mas eles já têm sido vislumbrados como um dos mais novos alvos terapêuticos para as doenças cardiovasculares (HABIYAKARE et al., 2014). Dessa forma, uma das abordagens utilizadas tem sido o desenvolvimento de bloqueadores eficientes do receptor MrgD. Estudos mostram que o antagonismo desse receptor é possível com a utilização de D-(Ala⁷)-Angiotensina I/II (1-7) (D-Pro), um outro antagonista do receptor Mas, por β-alanina e ácido gama-aminobutírico (GABA), mas não por A779 (LAUTNER; VILELLA; FRAGA-SILVA et al., 2013).

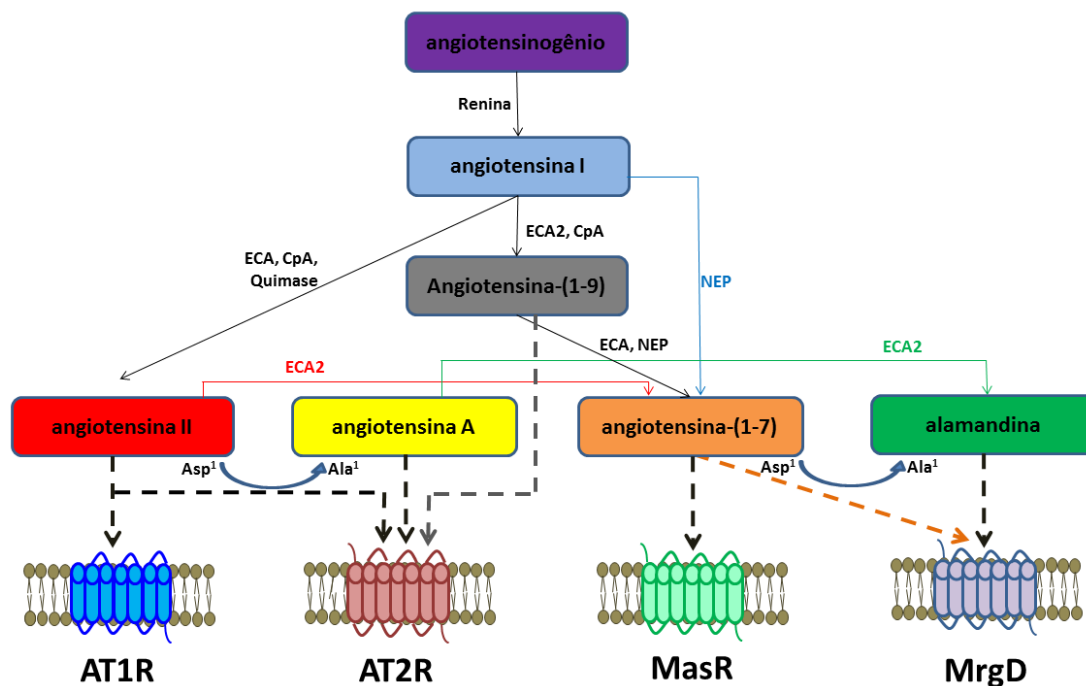


Figura 1: Esquema simplificado do sistema renina-angiotensina (SRA). As cascatas sequenciais de conversão do angiotensinogênio iniciadas pela renina culminam nos eixos opostos do SRA com a atuação principal das enzimas conversoras de angiotensinas (ECA e ECA2). O eixo clássico é composto pela via angiotensina II/receptor AT1R, mas esse peptídeo também pode interagir com o receptor AT2R e evocar efeitos opostos ao do AT1R. Já o alternativo é formado pela angiotensina-(1-7)/receptor Mas (MasR) e, recentemente, pela alamandina e o receptor MrgD. Outros produtos, como a angiotensina-(1-9) e a angiotensina A, também contribuem para a formação desse eixo alternativo. Outros metabólitos e enzimas não estão representados. Ala¹: alanina¹; Asp¹: aspartato¹; AT1R: receptor para angiotensina do tipo 1; AT2R: receptor para angiotensina do tipo 2; CpA: carboxipeptidase A; ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; MasR: receptor Mas; MrgD: receptor MrgD; NEP: endopeptidase N.

Além dos componentes do SRA presentes na circulação sanguínea, grande atenção tem sido dada aos SRA local e intracelular (CAREY; SIRAGY, 2003; NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011). O SRA local se encontra presente e amplamente distribuído em tecidos como o coração, vasos, rins, glândula adrenal, pâncreas e no sistema nervoso central e reprodutor, bem como no tecido adiposo e linfático (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011). A partir de estudos de expressão gênica e regulação, verificou-se a possibilidade de biossíntese de Ang II nesses locais, provavelmente, servindo como um mecanismo de manutenção da homeostasia ao nível tecidual (PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006). No que concerne ao SRA intracelular, ele é caracterizado pela presença de peptídeos e enzimas do SRA no interior da célula – seja por síntese intracelular ou por fagocitose –, bem como pela habilidade das células em sintetizarem Ang II e, a partir daí, evocar efeitos biológicos em sítios intracelulares (KUMAR, R.; SINGH; BAKER, 2009). Ele já foi identificado em vários tipos celulares, incluindo miócitos, neurônios e células renais (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011).

1.3 O SRA e o papel fisiopatológico de macrófagos

Macrófagos são um dos principais efetores da manutenção da homeostasia tecidual (GORDON; TAYLOR, 2005) e, por serem capazes de responder prontamente a diversos estímulos em seus microambientes através do processo de ativação, essas células têm suma importância no desenvolvimento e progressão de algumas doenças (MOSSER; ZHANG, 2008). Isso porque suas interações diretamente com outras células e com produtos celulares – como citocinas e quimiocinas – definem o papel dos macrófagos em uma determinada circunstância (EDWARDS et al., 2006; MOSSER; EDWARDS, 2008).

A inflamação crônica mediada por macrófagos dos fenótipos M1 e M2 é um mecanismo importante nas doenças cardiovasculares (MING et al., 2012; PARKS; LUSIS, 2013). Na aterosclerose, macrófagos são as células mais abundantes nas lesões, estando presentes desde eventos iniciais até os estágios mais tardios (HANSSON; LIBBY, 2006), desempenhando, portanto, um papel importante no início e progressão dessa doença (WOOLLARD; GEISSMANN, 2010). Além disso, foi observado que uma maior infiltração de macrófago do fenótipo M1 devido à ação de células T *helper* Th1 e T CD8+ citotóxicas no tecido adiposo leva ao aumento do estresse oxidativo e do desequilíbrio de sinais químicos, culminando na resistência insulínica (ROCHA; FOLCO, 2011). Outros estudos mostraram que macrófagos do fenótipo M2 são importantes para o correto reparo tecidual após infarto do miocárdio (BEN-MORDECHAI et al., 2013) e que a inibição dessas células pode exacerbar a disfunção cardíaca após esse evento (MA et al., 2013). Do mesmo modo, Van Der Meij et al. (2013) demonstraram a importância desse mesmo fenótipo para a ateroproteção e o reparo tecidual em pacientes humanos com aneurisma aórtico abdominal.

Na literatura, também já foi relatada presença de diversos componentes do SRA em macrófagos, como mostram os trabalhos a seguir. Okamura et al. (1999) demonstraram a presença do transcrito de angiotensinogênio e de renina (além de sua expressão proteica), bem como a atividade da ECA e expressão dos receptores AT1 e AT2 nessas células. Já foram demonstradas também a expressão e atividade da ECA2 para produção de Ang-(1-7) em macrófagos (THATCHER et al., 2011), bem como a própria expressão do receptor Mas (SOUZA; COSTA-NETO, 2012; HAMMER et al., 2016). Além disso, a expressão de outros peptídeos, como a Ang I e Ang II já foi demonstrada nessas células (RAFATIAN et al., 2013). O SRA exerce grande influência sobre a fisiologia e função dessas células, como demonstrado no trabalho de Okamura et al. (1999), no qual o SRA era marcadamente ativado em monócitos THP-1 quando estes eram diferenciados *in vitro* em macrófagos, o que poderia ser um dos mecanismos pelos quais a formação de placas ateroscleróticas

ocorreria. Além disso, foi observado que a deleção de ECA em macrófagos peritoneais murínicos polarizados ao fenótipo M1 *in vitro* alterava o perfil de secreção de importantes moléculas efetoras dessas células, demonstrando a diminuição da função dos macrófagos (LIN et al., 2011). De forma semelhante, a deleção de AT1, apesar de não ter alterado o conteúdo de células mieloides da medula óssea, prejudicou seu processo de maturação, uma vez que a ação da Ang II sobre esse receptor regula a expressão do receptor do fator estimulante de colônia de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF em inglês) presente nas células da linhagem mielóide (TSUBAKIMOTO et al., 2009). O trabalho de Lu et al. (2008), por sua vez, mostrou que a inibição da enzima renina, bem como sua deficiência total em macrófagos, diminuiu tanto a adesão leucocitária às células endoteliais quanto as lesões ateroscleróticas em camundongos com deleção genética para o receptor de lipoproteína de baixa densidade. Além disso, a deficiência do receptor AT2 nas células medula óssea de animais transplantados agrava o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a aterosclerose (KATO et al., 2014).

A regulação e atuação do SRA em macrófagos são extremamente importantes, dada a participação de ambos em doenças inflamatórias e cardiovasculares (OKAMURA et al., 1999; TSUBAKIMOTO et al., 2009; LIN et al., 2011). Souza; Costa-Neto (2012) demonstraram que o peptídeo Ang-(1-7) evoca uma redução da resposta inflamatória em macrófagos induzidos por LPS *in vitro*, o que ajuda a explicar a redução das placas ateroscleróticas observada por Lovren et al. (2008) e a melhoria na estabilidade das placas maduras por Yang et al. (2013). Porém, não existem estudos relatando o efeito da Ang-(1-7) em macrófagos do fenótipo M2a – igualmente importante para o estudo de doenças inflamatórias e cardiovasculares –, apenas dados sobre a influência da deleção do receptor Mas e o uso de um análogo da Ang-(1-7), o AVE 0991, sobre esse fenótipo (HAMMER et al., 2016; SKIBA et al., 2016). Além disso, não existem dados sobre a influência da ativação da via alamandina/MrgD na polarização *in vitro* de macrófagos. Portanto, o estudo do efeito de peptídeos como Ang-(1-7) e do novo componente do SRA, a alamandina, torna-se de grande valia, podendo fornecer detalhes sobre a fisiologia dessas células, bem como abrir novos horizontes para o potencial terapêutico desses peptídeos na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias.

Dessa forma, podem ser destacados três pontos sobre a literatura envolvendo macrófagos e o SRA: (1) a Ang-(1-7) via receptor Mas, em um modelo de polarização *in vitro* de macrófagos peritoneais murínicos da linhagem C57BL/6j, reduziu a resposta inflamatória de macrófagos do fenótipo M1; (2) os efeitos finais da alamandina via receptor MrgD são similares aos da Ang-(1-7); e (3) o MrgD é provavelmente expresso em macrófagos de coelho. Considerando todo o exposto, no presente trabalho, formulou-se a hipótese de que a

Ang-(1-7) e a alamandina são capazes de alterar o perfil inflamatório de macrófagos murínicos derivados da medula óssea no modelo de polarização *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a utilizado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos peptídeos Ang-(1-7) e alamandina no perfil fenotípico de macrófagos derivados da medula óssea *in vitro* de camundongos da linhagem FVB/N polarizados a M1 e M2a.

2.2 Objetivos Específicos

(1) caracterizar os fenótipos M1 e M2a, obtidos pela diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos FVB/N *in vitro*, por meio da expressão diferencial do transcrito de genes anti- e pró-inflamatórios, secreção de TNF α , produção de NO e EROs, além de alterações de aspectos morfológicos;

(2) comparar a expressão de RNAm dos genes codificadores para os receptores Mas e MrgD, bem como identificar o padrão da expressão celular desses receptores por imunofluorescência, entre os fenótipos M1 e M2a;

(3) caracterizar a resposta da expressão gênica dos marcadores dos fenótipos M1 e M2a, respectivamente, TNF α e YM-1 frente a diferentes concentrações de Ang-(1-7) e alamandina;

(4) avaliar o efeito da Ang-(1-7) e da alamandina na expressão de genes pró- e anti-inflamatórios em macrófagos polarizados aos fenótipos M1 e M2a; e

(5) confirmar a participação dos receptores Mas e MrgD nos efeitos observados após o tratamento com Ang-(1-7) e alamandina, respectivamente, por meio do antagonismo farmacológico utilizando A779 e D-Pro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese da metodologia adotada no presente trabalho está apresentada ao final desta seção (figura 2).

3.1 Animais

Camundongos machos da linhagem FVB/N com idade entre 8-10 semanas foram obtidos do Biotério de Experimentação do Laboratório de Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). A linhagem FVB/N é isogênica e tem sido utilizada com sucesso na criação de animais transgênicos e com deleção para diversos genes (TAKETO et al., 1991), além de serem importantes, por exemplo, em pesquisas sobre câncer (HENNINGSS et al., 1993) e doenças inflamatórias e cardiovasculares como a asma e a aterosclerose (ZHU; GILMOUR, 2009; TEUPSER et al., 2006), dentre outras. Os animais foram aclimatados por duas semanas no biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia e Biofísica antes do início dos experimentos em *racks* ventiladas próprias para camundongos. Os animais tiveram livre acesso à água e ração desde o biotério até o término dos protocolos experimentais. Os procedimentos envolvendo os camundongos descritos no presente trabalho estão registrados na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) sob o número 340/2016.

3.2 Isolamento e cultivo de macrófagos derivados da medula óssea (MφMO)

O isolamento de MφMO foi adaptado do protocolo descrito por Gonçalves; Mosser (2015). Os animais foram eutanasiados por meio de sedação com isoflurano a 3% com posterior deslocamento cervical dentro do fluxo laminar previamente esterilizado. A pele do abdômen foi retirada sem dano à membrana peritoneal até ambos os membros inferiores para que saísse completamente. Em seguida, na articulação coxofemoral os membros inferiores foram desarticulados e separados da carcaça do animal, sendo acondicionados em álcool 70% por, aproximadamente, 10 minutos. Os membros foram transferidos para placas de Petri contendo solução salina fosfatada 1x concentrada estéril sem íons cálcio e magnésio (SSF 1x) (pH = 7,2-7,4). Os membros foram desarticulados nas articulações fêmuro-tibial e tíbio-társica e a camada muscular foi retirada. As epífises dos fêmures e tíbias foram cortadas, de modo a expor a cavidade medular e, utilizando-se uma seringa de 10mL e agulha 26G estéreis, a medula foi retirada por meio da aplicação de SSF 1x na cavidade medular.

As células obtidas foram centrifugadas a 350g, 4°C, por dez minutos e o sobrenadante foi retirado. O pélete foi reconstituído em DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado com 20% de sobrenadante da cultura de fibroblastos da linhagem L929 contendo M-CSF, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Estados Unidos) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco, Estados Unidos). As células foram cultivadas em placas não tratadas e acondicionadas em estufa incubadora de CO₂ a 5% a 37°C por 72 horas, período após o qual meio de cultura fresco anteriormente descrito foi acrescentado. No oitavo dia, quando da observação de células espalhadas no assoalho da placa de Petri, deu-se início aos protocolos de bioquímica, biologia molecular e imunofluorescência.

3.3 Polarização *in vitro* de M ϕ MO aos fenótipos M1 e M2a

A polarização *in vitro* de M ϕ MO foi realizada como descrita por Pelegrin; Surprenant (2009) para todos os protocolos experimentais a seguir. Após oito dias, foi feita a lavagem do cultivo com SSF 1x e adicionado meio DEMEM/F12 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado com 10% de SFB (Gibco, Estados Unidos) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco, Estados Unidos). Foram definidos então três grupos de células: não estimulado, M1 e M2a. O primeiro grupo recebeu apenas o meio de cultura e veículo (água mili-Q), ao passo que, aos grupos M1 e M2a, foram adicionados estímulos específicos para que ocorresse polarização *in vitro* dessas células. LPS (1 μ g/mL) (obtido de *Escherichia coli* O55:B5, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e IFN- γ (PrepoTech, Estados Unidos) (20ng/mL) foram utilizados para polarizar as células a M1. IL-4 (PrepoTech, Estados Unidos) (20 ng/mL) foi utilizada para polarizar as células ao fenótipo M2a. O protocolo teve duração total de quatro horas, período durante o qual as culturas de M ϕ MO foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera citadas no tópico 3.2.

Para que a evolução do trabalho seja melhor compreendida, os protocolos de biologia molecular, microscopia e ensaios bioquímicos serão divididos em quatro partes.

3.4 PARTE 1: Caracterização de M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a

Após os protocolos descritos nos tópicos 3.2 e 3.3, os fenótipos M1 e M2a no modelo foram caracterizados utilizando os protocolos a seguir.

3.4.1 Análise da morfologia celular de macrófagos por faloidina

A morfologia celular dos macrófagos polarizados *in vitro* dos grupos não estimulado, M1 e M2a foi avaliada por microscopia de fluorescência para a sonda faloidina conjugada com Alexa Fluor® 546 (Molecular Probes, Estados Unidos). Após o término da polarização *in vitro* utilizando 10^5 células, as células foram lavadas com SSF 1x e fixadas por 10 minutos à temperatura ambiente com paraformaldeído (PFA) a 4%. Em seguida, foram incubadas com uma solução de 0,1% de Triton X-100 em SSF 1x concentrado por 3-5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, com uma solução contendo faloidina, SSF 1x e albumina sérica bovina (BSA) (1:100) por 20 minutos à temperatura ambiente protegido da luz direta incidente. A solução foi removida para montagem das lâminas com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Estados Unidos) em Fluoromount G (SouthernBiotech, Estados Unidos). Entre cada uma das etapas de incubação mencionadas anteriormente, as lamínulas foram lavadas com SSF 1x por três vezes para retirada das soluções utilizadas. A leitura da fluorescência foi imediatamente realizada em DsRed (excitação a 560nm) na lente objetiva de óleo de imersão com capacidade de aumento de 40x no microscópio Apotome.2 (Zeiss, Estados Unidos). As fotos foram feitas com auxílio de câmera AxioCam 503 Color (Zeiss, Estados Unidos) e foram analisadas no programa Zen2 (Zeiss, Estados Unidos), com o qual foram obtidos dados de área (μm^2) e diâmetro (μm) celular de 60-90 células por grupo.

3.4.2 Da extração do RNA total à reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Após o término do período de polarização *in vitro* (tópico 3.3), o RNA de 10^7 células foi coletado com o uso de TRIzol (Ambion, Estados Unidos) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante e foi, posteriormente, dosado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase *Amplification Grade* (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como descrito pelo fabricante e dosadas novamente. As amostras de RNA foram utilizadas na reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para obtenção de fitas complementares de ácido desoxirribonucleico (cDNA), de acordo com protocolo disponibilizado pelo fabricante para a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Estados Unidos).

A qPCR foi utilizada para a caracterização dos fenótipos M1 e M2a e as expressões relativas de Arg1, Arg2, TNF α , IL-1 β , IL-10, MasR, MrgD, YM-1, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), quimiocina motivo (C-C) ligante 2 (CCL2), CD206 e FIZZ-1 em ambos os grupos foram avaliadas por meio do método de C_t comparativo ($\Delta\Delta C_t$). Os níveis de expressão do transcrito de todos os alvos foram normalizados pelo controle endógeno, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As respectivas sequências nucleotídicas, concentrações, fabricantes e referências dos iniciadores utilizados no presente trabalho estão dispostas no Anexo I. O método de detecção utilizado foi SYBR Green® e a qPCR foi composta por 40 ciclos. Os resultados estão dispostos em unidades arbitrárias (U.A.) e foram previamente corrigidos pelo seu respectivo grupo controle. Para esse protocolo, foi utilizado o equipamento Life Vii 7 (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) e os dados foram analisados por meio do programa QuantStudio™ Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos).

3.4.3 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para TNF α

Após a polarização *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a descrita no tópico 3.3, foi recolhido 1mL do sobrenadante da cultura de M ϕ MO contendo os produtos secretados pelos grupos não estimulado, M1 e M2a. Foram utilizados reagentes e placas específicas para este ensaio; e o protocolo seguiu as orientações dadas pelo fabricante (R&D Systems, Estados Unidos). O conteúdo de TNF α secretado pelas células foi analisado por espectrofotometria 30 minutos após o final do protocolo, com leitura na faixa de 405-450nm.

3.4.4 Análise do conteúdo de nitrito (NO₂⁻) pelo método de Griess

Após o período de polarização *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a indicado no tópico 3.3, 1mL de sobrenadante de 10⁵ células foi coletado para análise do conteúdo de NO₂⁻ pelo método de Griess, como descrito pelo fabricante (Promega, Estados Unidos) para análise indireta da liberação de NO pelas células. Utilizando-se uma placa de 96 poços de fundo chato, montou-se uma curva-padrão de NO₂⁻ e as amostras dos grupos não estimulado, M1 e M2a foram colocadas em triplicata. Incubou-se a placa com solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico a 5% por 5 minutos e, em seguida, adicionou-se solução de dicloridato de N-(1-naftil)-etilenodiamina a 0,1%. Após 5 minutos, foi realizada a leitura da placa em 520 nm por meio de espectrofotômetro de placa.

3.4.5 Análise da formação de EROs

Os MφMO foram incubados com sonda seletiva para EROs após o protocolo de polarização *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a em procedimento adaptado de Xiong et al. (2014). A formação das EROs foi detectada por meio de fluorescência do di-hidroetídio (DHE) (Molecular Probes, Estados Unidos), incubando-se 10⁵ células com essa sonda (10μM) por 30 minutos a 37°C. O excesso foi removido por lavagem com SSF 1x antes da montagem das lâminas com DAPI em Fluoromount G.

A leitura imediata da fluorescência de DHE foi realizada com excitação a 560nm no microscópio Apotome.2 (Zeiss, Estados Unidos) na lente objetiva de óleo de imersão com capacidade de aumento de 40x no microscópio. As fotos foram feitas com auxílio de câmera AxioCam 503 Color (Zeiss, Estados Unidos) e foram analisadas no programa Fiji (SCHINDELIN et al., 2012), com o qual foram obtidos dados de área (μm²) intensidade de fluorescência integrada de 43-52 células por grupo.

3.4.6 Imunofluorescência para os receptores Mas e MrgD

A expressão e localização dos receptores Mas e MrgD nos grupos não estimulado, M1 e M2a foi avaliada após o protocolo de polarização *in vitro* de 10⁵ MφMO. As células foram lavadas com SSF 1x concentrado e fixadas por 15 minutos à temperatura ambiente com PFA a 4%. Em seguida, as membranas celulares foram permeabilizadas com uma solução de 0,5% de Triton X-100 em SSF 1x concentrado por 10 minutos à temperatura ambiente. Então, as amostras foram incubadas com solução de BSA a 5% e Tween-20 em tampão por 1 hora à temperatura ambiente. O excesso de solução foi retirado com SSF 1x e incubou-se o material com anticorpo primário para o receptor Mas (Alomone Labs, Estados Unidos) ou anticorpo primário para MrgD (fabricante não informado por motivos de escrita de artigo científico), ambos a 1:300, em solução de bloqueio em pernoite a 4°C. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente conjugado com Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes, Estados Unidos) (1:450) para detecção do receptor Mas ou Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Estados Unidos) (1:300) para MrgD em tampão por 1 hora, período após o qual o excesso de solução foi retirado com auxílio de SSF 1x e as lâminas foram montadas em Fluormount G após coloração do núcleo por DAPI (1:150). Entre cada uma das etapas de incubação mencionadas anteriormente, as lamínulas foram lavadas com SSF 1x por três vezes para retirada das soluções utilizadas.

A leitura da fluorescência foi imediatamente realizada em com excitação a 488nm para o MrgD e 560nm para o receptor Mas, na lente objetiva de óleo de imersão com capacidade de aumento de 40x no microscópio Axio Imager Apotome.2 (Zeiss, Estados Unidos). As fotos foram feitas com auxílio de câmera AxioCam 503 Color (Zeiss, Estados Unidos) e foram analisadas no programa Fiji (SCHINDELIN et al., 2012), com o qual foram obtidos dados de área (μm^2) e intensidade de fluorescência integrada de 42-50 células por grupo.

3.5 PARTE 2: Diagrama de concentração-resposta para os peptídeos Ang-(1-7) e alamandina

O efeito de diferentes concentrações de Ang-(1-7) (Biosyntan, Estados Unidos) e alamandina (Biosyntan, Estados Unidos) foi avaliado pelo tratamento de 10^5 M ϕ MO com esses peptídeos nas concentrações de 10^{-9}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M e 10^{-6}M após trinta minutos do início da polarização *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a (tópico 3.3) para avaliação da reposta gênica dos marcadores. O RNA total foi coletado para análise da expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para TNF α (fenótipo M1) e YM-1 (fenótipo M2a) por qPCR como descrito no tópico 3.4.2.

3.6 PARTE 3: Tratamento de M ϕ MO com Ang-(1-7) e alamandina a 10^{-7}M durante polarização *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

Para o tratamento com Ang-(1-7) e alamandina, foram formados três novos grupos: um grupo controle e dois grupos-teste – tratado com Ang-(1-7) e tratado com alamandina. Cada grupo foi composto pelos três grupos citados no tópico 3.3: não estimulado, M1 e M2a. Após trinta minutos do início da polarização *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a, nos protocolos pertinentes, as 10^7 células foram tratadas com Ang-(1-7), alamandina, ambas a 10^{-7}M , ou veículo (água mili-Q). A concentração de uso dos peptídeos foi definida a partir do diagrama de concentração-resposta de expressão gênica para TNF α e YM-1 descrito no tópico 3.5. O RNA total foi coletado para análise da expressão de RNAm para TNF α , IL-1 β , IL-10, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e quimiocina motivo (C-C) ligante 2 (CCL2) (fenótipo M1); e YM-1, CD206 e FIZZ-1 (fenótipo M2a) por qPCR como descrito no tópico 3.4.2. O tempo de exposição das células à Ang-(1-7) ou alamandina foi definido de

modo a permitir a avaliação da resposta aguda das células ao tratamento com os peptídeos dentro do tempo de polarização mencionado no tópico 3.3.

3.7 PARTE 4: Antagonismo farmacológico dos receptores Mas e MrgD em M ϕ MO dos fenótipos M1 e M2a

O antagonismo farmacológico dos receptores Mas e MrgD foi utilizado para identificar a participação desses receptores no efeito da Ang-(1-7) e alamandina, respectivamente, sobre os fenótipos M1 e M2a. Para isso, foram utilizados A779 (Biosyntan, Estados Unidos) para antagonizar o receptor Mas; e D-Pro (Bachem, Suíça), para MrgD. Ambos os antagonistas foram utilizados a 1 μ M. O protocolo consistiu em administrar os antagonistas nas respectivas placas (contendo 10⁵ células) 5 minutos após o início da polarização e 25 minutos antes do tratamento com Ang-(1-7) e alamandina. Concentração e tempo de exposição das células aos peptídeos foram adaptados a partir de estudos anteriores de Souza; Costa-Neto (2012). O RNA total foi coletado para análise da expressão de RNAm para TNF α , IL-1 β e CCL2 (fenótipo M1); e YM-1 (fenótipo M2a) por qPCR.

3.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism e foi utilizado teste-t não-pareado para a comparação entre as variâncias dos fenótipos M1 e M2a entre as variâncias dos grupos controle e tratado, inclusive no diagrama de concentração-resposta e nos gráficos com presença de bloqueadores. Para o experimento de ELISA e faloidina, foi utilizado o teste *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para comparação entre as variâncias dos grupos não estimulado, M1 e M2a. Todas as amostras foram submetidas a testes de normalidade e de verificação de possíveis valores atípicos previamente aos testes estatísticos, e o nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

METODOLOGIA

Isolamento de células da medula óssea de camundongos machos FVB/N (idade: 8-10 semanas)

Diferenciação celular em macrófagos derivados da medula óssea por M-CSF (8 dias)

Polarização de macrófagos derivados da medula óssea *in vitro*
(4 horas)

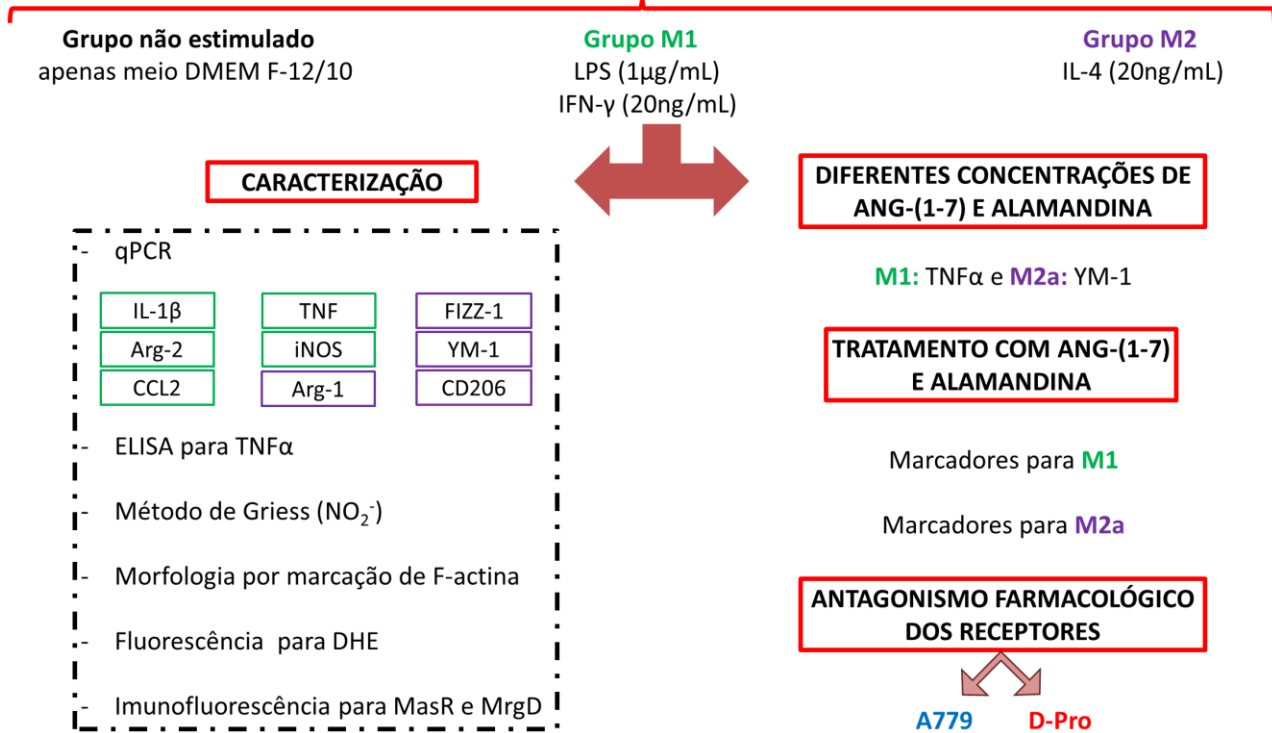


Figura 2: Esquema da metodologia adotada no presente trabalho. Com a obtenção de MφMO polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a, procedeu-se à caracterização de ambos utilizando-se abordagens de bioquímica, biologia molecular e fluorescência. A avaliação dos efeitos dos tratamentos com Ang-(1-7) e alamandina foi feita a partir da análise de diferentes concentrações de ambos os peptídeos sobre os fenótipos M1 e M2a, após a qual foram escolhidos marcadores utilizados na caracterização destes. O antagonismo farmacológico dos receptores MasR e MrgD foi utilizado para corroborar a participação destes nos efeitos observados.

4. RESULTADOS

4.1 PARTE 1: Caracterização de M ϕ MO polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

4.1.1 Análise da morfologia celular por meio de faloidina

A análise da morfologia celular de M ϕ MO dos grupos não estimulado, M1 e M2a por meio de faloidina, que se liga ativamente à F-actina, mostrou que esta está presente em todo o citoplasma, concentrando-se nas regiões perimembranares dessas células. Além disso, foi observado os M ϕ MO são células com uma tendência ao formato fibroblástico, com núcleos grandes e circulares (figura 3A).

A quantificação da área celular média de M ϕ MO dos grupos não estimulado, M1 e M2a mostrou que não existem diferenças morfológicas entre eles no que concerne a esse parâmetro (não estimulado: $417,88 \pm 63,90\mu\text{m}^2$, n=8; M1: $407,90 \pm 34,12\mu\text{m}^2$, n=8; e M2a: $418,60 \pm 43,74\mu\text{m}^2$, n=7; p=0,9853) (figura 3B). A polarização *in vitro* de M ϕ MO a M1 não permitiu sua distinção em relação a M2a utilizando-se a área celular média ($407,90 \pm 34,12\mu\text{m}^2$, n=8 *versus* $418,60 \pm 43,74\mu\text{m}^2$, n=7; p=0,8481) (figura 3C). Da mesma forma, as células dos três grupos supracitados não apresentam diâmetros celulares médios diferentes (não estimulado: $21,47 \pm 1,42\mu\text{m}$, n=8; M1: $20,10 \pm 0,95\mu\text{m}$, n=8; M2a: $21,89 \pm 1,14\mu\text{m}$, n=7; p=0,5490), como mostra a quantificação desse parâmetro na figura 3D, e os fenótipos M1 e M2a não podem ser distinguidos a partir deste (M1: $20,10 \pm 0,95\mu\text{m}$, n=8 *versus* M2a: $21,89 \pm 1,14\mu\text{m}$, n=7; p=0,2462) (figura 3E).

Assim, conclui-se, a partir da análise da distribuição de F-actina e das medidas de área e diâmetro, que não é possível a distinção entre M ϕ MO de camundongos FVB/N polarizados aos fenótipos M1 e M2a por quatro horas.

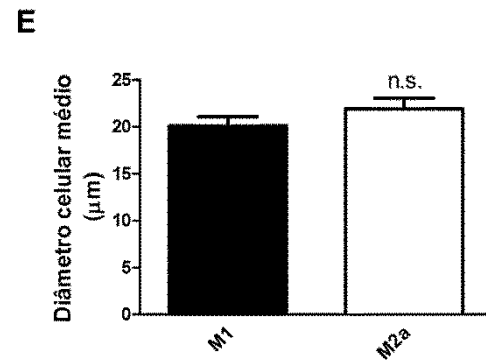
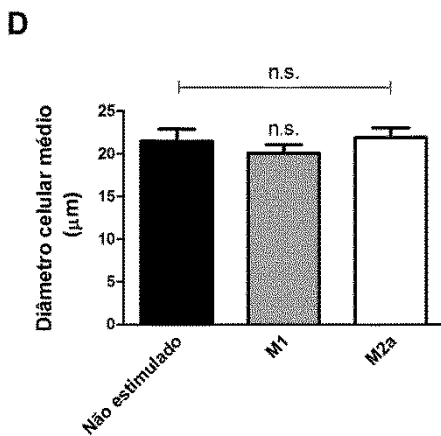
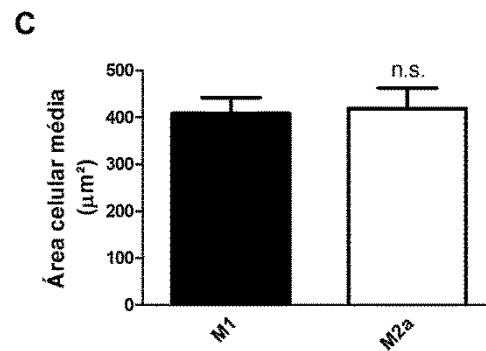
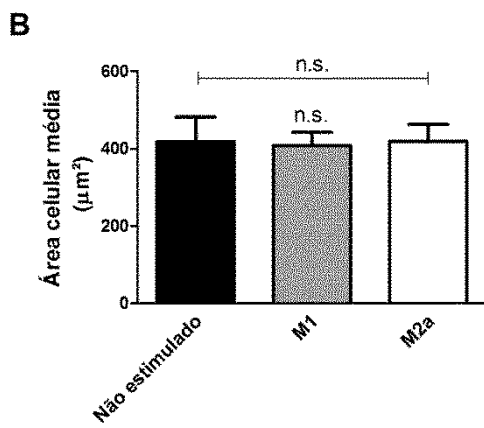
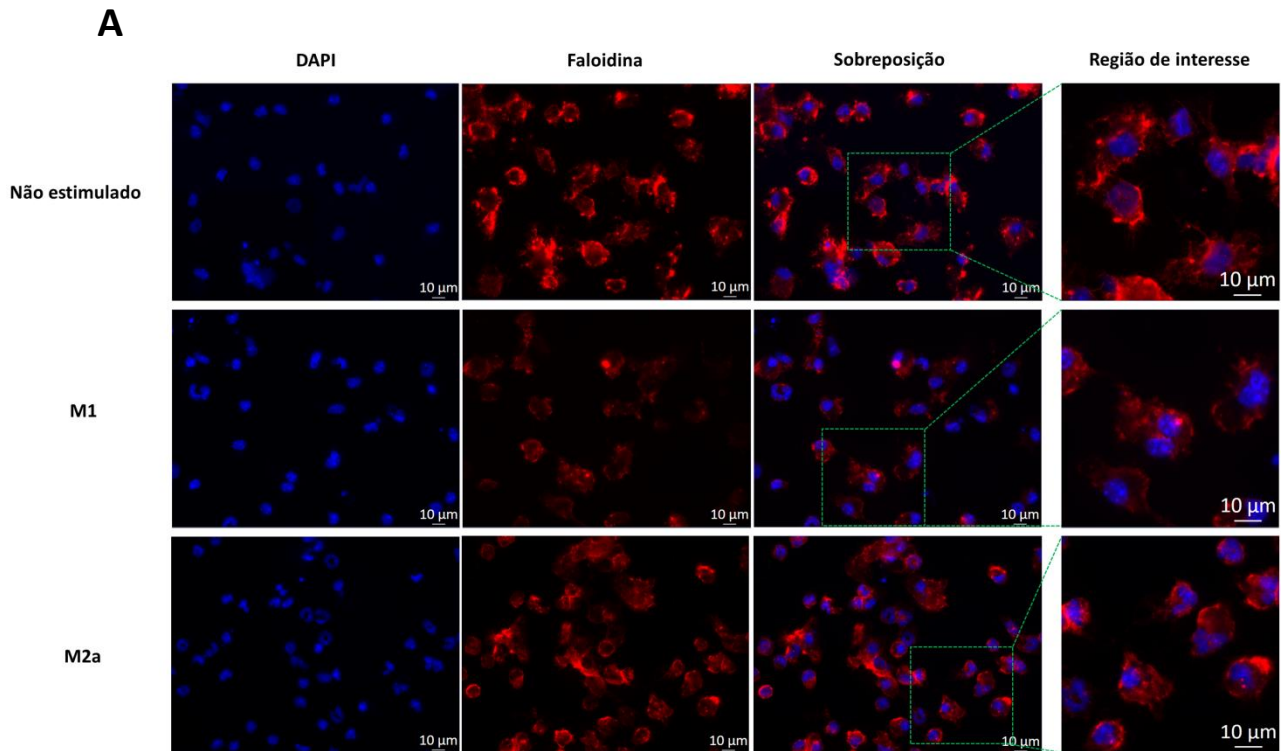


Figura 3: Análise da morfologia celular de MφMO por meio de marcação de F-actina por faloidina. (A) Imagens representativas da distribuição de F-actina (vermelho) em MφMO dos grupos não estimulado, M1 e M2a, evidenciando o contorno e forma celulares, nos quais os núcleos estão corados por DAPI (azul). (B)

Quantificação da área celular média (μm^2) em M ϕ MO dos grupos não estimulado, M1 e M2a e (C) ausência de diferença nesse parâmetro entre os fenótipos M1 e M2a. (D) Quantificação do diâmetro celular médio (μm) em M ϕ MO dos grupos não estimulado, M1 e M2a e (E) ausência de diferença nesse parâmetro entre os fenótipos M1 e M2a. n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 7-8 experimentos independentes, com 60-90 células/grupo.

4.1.2 Expressão do RNAm de genes marcadores em M ϕ MO polarizados *in vitro* ao fenótipo M1

Para a caracterização do fenótipo M1, foram utilizados os iniciadores para TNF α , CCL2, IL-1 β , iNOS e Arg2. A figura 4 mostra que existe expressão diferencial de RNAm em M1 em relação a M2a, com aumento de expressão para os genes de TNF α (M1: $9,23 \pm 1,59\text{U.A.}$, n=12 *versus* M2a: $1,61 \pm 0,47\text{U.A.}$, n=12; p=0,0001), CCL2 (M1: $7,53 \pm 1,34\text{U.A.}$, n=14 *versus* M2a: $1,90 \pm 0,52\text{U.A.}$, n=14; p=0,0006), IL-1 β (M1: $6,69 \pm 1,07\text{U.A.}$, n=11 *versus* M2a: $0,77 \pm 0,10\text{U.A.}$, n=10; p<0.0001) e iNOS (M1: $29,63 \pm 13,08\text{U.A.}$, n=9 *versus* M2a: $1,11 \pm 0,22\text{U.A.}$, n=9; p=0,0445). Para o gene Arg2, não foi encontrada diferença de expressão entre os fenótipos M1 e M2a (M1: $1,31 \pm 0,28\text{U.A.}$, n=7 *versus* $1,04 \pm 0,19\text{U.A.}$, n=7; p=0,4406). Dessa forma, como marcadores para o fenótipo M1 foram considerados os genes TNF α , IL-1 β , CCL2 e iNOS.

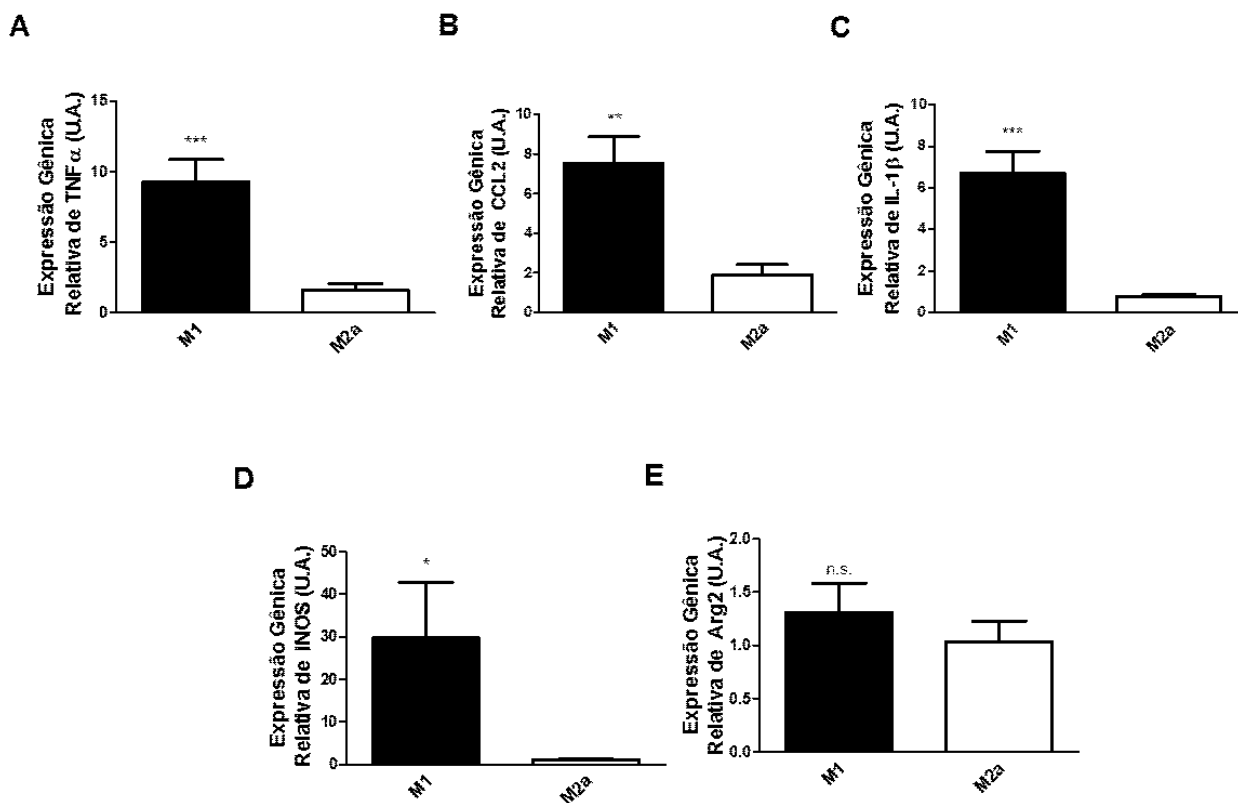


Figura 4: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M1. (A-D) Expressão diferencial de RNAm para TNF α , IL-1 β , CCL2 e iNOS, respectivamente, no fenótipo M1 (barra preta) em

relação ao fenótipo M2a (barra branca). (E) Para Arg2, o nível de expressão de RNAm não difere entre os fenótipos M1 e M2a, *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 7-14 experimentos independentes, com 10^7 células/grupo.

4.1.3 Análise da expressão da citocina TNF α por ELISA em M ϕ MO polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

A análise, por meio de ELISA, da liberação da citocina TNF α por M ϕ MO para o sobrenadante mostrou que o fenótipo M1 secreta uma maior quantidade de TNF α ($159,10 \pm 10,73$ pg/mL, $n=4$; $p < 0,0001$) em relação a M2a e ao grupo não estimulado, nos quais essa citocina não foi detectada (figura 5).

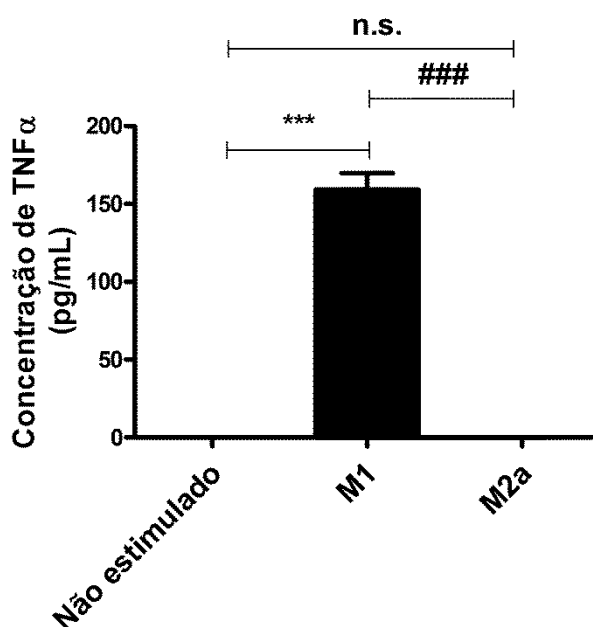


Figura 5: Concentração de TNF α em pg/mL no sobrenadante de cultura de M ϕ MO dos grupos não estimulado e polarizado a M1 e M2a. Observa-se que os M ϕ MO polarizados ao fenótipo M1 (barra preta) secretam maior quantidade de TNF α no meio extracelular e os níveis dessa citocina nos grupos não estimulado e M2a são foram detectados. *** e ###: $p < 0.001$; n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes, com 1mL de sobrenadante de 10^7 células/grupo.

4.1.4 Análise da formação de EROs por fluorescência de DHE em M ϕ MO polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

A quantificação da formação de EROs em M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a foi utilizada como indicativo da ativação de vias intracelulares relacionadas ao fenótipo M1. Na figura 6A observa-se a formação difusa de EROs indicada pela

fluorescência de DHE. A figura 6B representa a quantificação da intensidade de fluorescência em U.A., previamente corrigida pelo grupo não estimulado, na qual pode-se observar que não foi encontrada diferença na formação de EROs em M1 quando comparado a M2a (M1: $0,81 \pm 0,10$ U.A., $n=4$ versus M2a: $0,89 \pm 0,08$ U.A., $n=4$; $p=0,5416$).

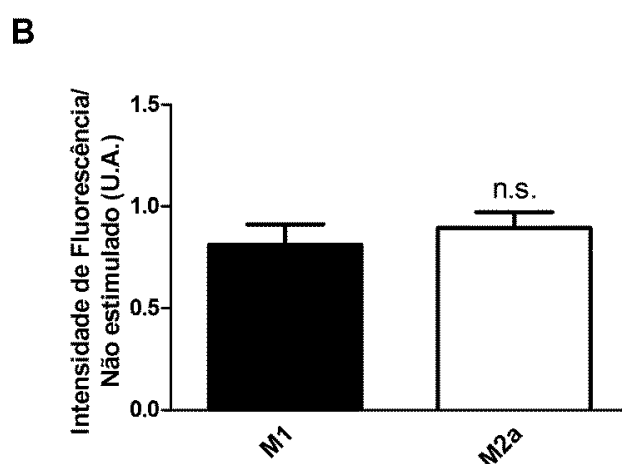
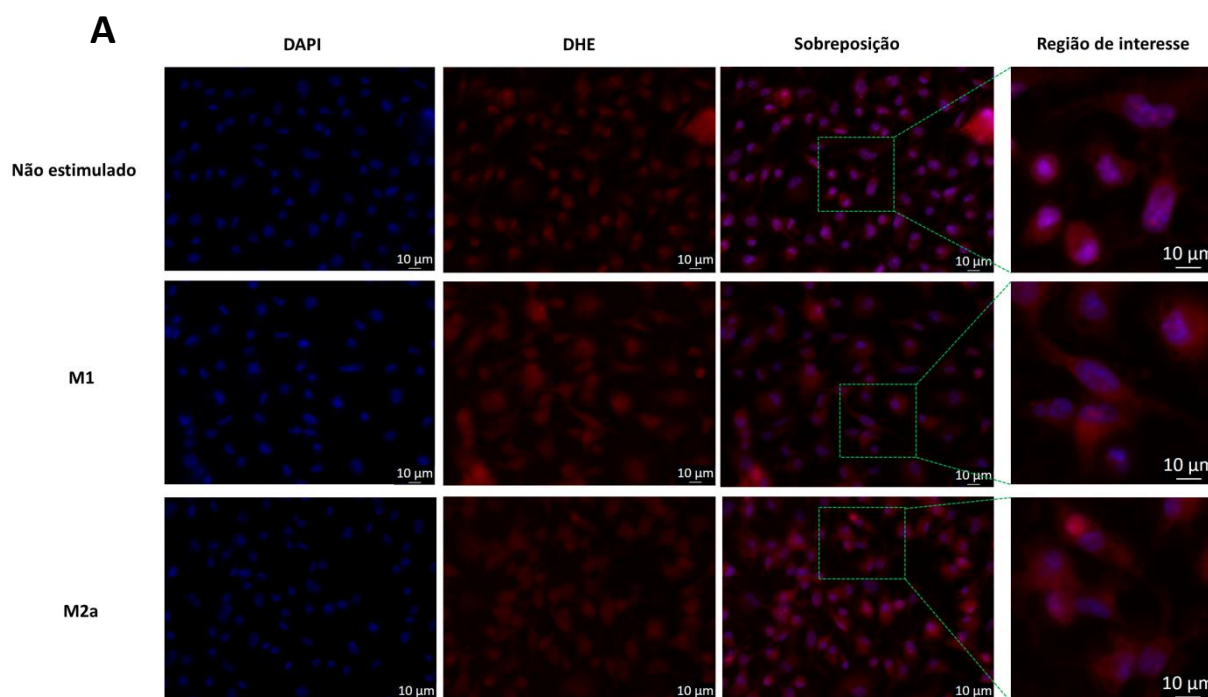


Figura 6: Formação de EROs por meio de fluorescência de DHE em M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a. (A) Imagens representativas da detecção de formação de EROs por DHE (vermelho) em M ϕ MO dos grupos não estimulado, M1 e M2a, nos quais os núcleos estão corados por DAPI (azul). (B) Quantificação da intensidade de fluorescência de DHE corrigida pelo grupo não estimulado em U.A. nos fenótipos M1 (barra preta) e M2a (barra branca), entre os quais não foi observada diferença de formação de EROs. n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes, com 10^5 células/grupo.

4.1.5 Análise da concentração de NO_2^- pelo método de Griess em $\text{M}\phi\text{MO}$ polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

A quantificação de NO_2^- em $\text{M}\phi\text{MO}$ polarizados aos fenótipos M1 e M2a foi utilizada como medida indireta e proporcional da liberação de NO por essas células. A figura 7 representa a concentração do NO_2^- (μM) nos fenótipos M1 e M2a. Nota-se que, pelo método adotado, não foi observada diferença entre os fenótipos M1 e M2a (M1: $19,60 \pm 1,53\mu\text{M}$, $n=6$ versus M2a: $18,48 \pm 0,71\mu\text{M}$, $n=6$; $p=0,5204$).

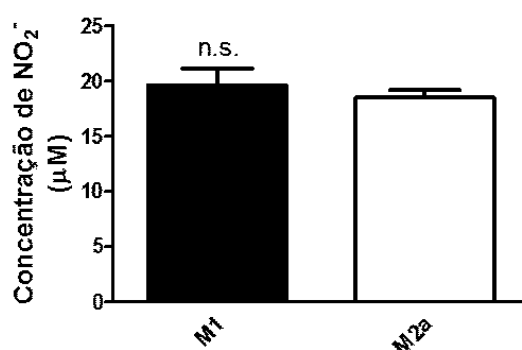


Figura 7: Concentração de NO_2^- em μM em $\text{M}\phi\text{MO}$ polarizados aos fenótipos M1 e M2a. Não se observa diferenças de concentração desse composto entre M1 (barra preta) e M2a (barra branca). n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 6 experimentos independentes, com 1mL de sobrenadante de 10^7 células/grupo.

4.1.6 Expressão do RNAm de genes marcadores em $\text{M}\phi\text{MO}$ polarizados *in vitro* ao fenótipo M2a

Para a caracterização do fenótipo M2a, foram utilizados os iniciadores clássicos para este fenótipo, previamente descritos na literatura como CD206, YM-1 e FIZZ-1, e outros menos citados, Arg1 e IL-10. A figura 8 mostra a expressão diferencial do transcrito em M2a em relação a M1 para os genes CD206 (M1: $0,81 \pm 0,18\text{U.A.}$, $n=13$ versus M2a: $2,85 \pm 0,38\text{U.A.}$, $n=12$; $p<0,0001$), YM-1 (M1: $0,89 \pm 0,20\text{U.A.}$, $n=14$ versus M2a: $5,76 \pm 1,14\text{U.A.}$, $n=14$; $p=0,0003$) e FIZZ-1 (M1: $1,02 \pm 0,17\text{U.A.}$, $n=16$ versus M2a: $26,62 \pm 7,46\text{U.A.}$, $n=14$; $p=0,0010$). Para o gene Arg1 não foi encontrada diferença de expressão entre os fenótipos M1 e M2a (M1: $3,66 \pm 1,63\text{U.A.}$, $n=10$ versus M2a: $2,21 \pm 0,55\text{U.A.}$, $n=10$; $p=0,4106$). O RNAm para o gene de IL-10, interessante, foi mais expresso no fenótipo M1 em relação a M2a (M1: $3,29 \pm 0,69\text{U.A.}$, $n=11$ versus M2a: $0,90 \pm 0,17\text{U.A.}$, $n=11$; $p=0,0031$). Portanto, nos próximos resultados, esse gene será representado

juntamente com os outros marcadores para M1. Como marcadores para o fenótipo M2a, portanto, foram considerados os genes CD206, YM-1 e FIZZ-1.

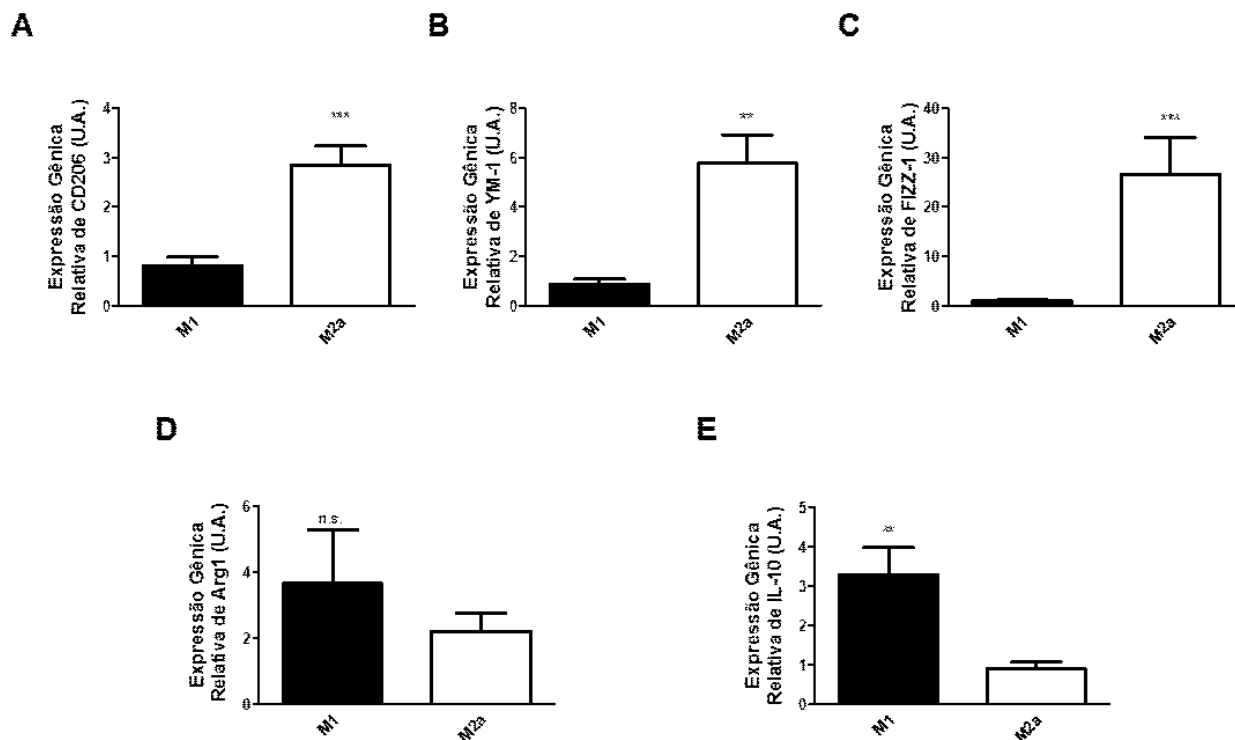


Figura 8: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M2a. (A-C) Expressão diferencial de RNAm para CD206, YM-1 e FIZZ-1, respectivamente, no fenótipo M2a (barra branca) em relação ao fenótipo M1 (barra preta). (D) Para Arg1, o nível de expressão de RNAm não difere entre os fenótipos M1 e M2a. (E) Para IL-10, observou-se maior expressão do RNAm para esse gene no fenótipo M1 em relação a M2a. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 10-12 experimentos independentes, com 10^7 células/grupo.

4.1.7 Receptores Mas e MrgD em M ϕ MO polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

4.1.7.1 Expressão de RNAm dos genes para os receptores Mas e MrgD

A figura 9 mostra que não existe diferença na expressão de RNAm entre os fenótipos M1 e M2a para os receptores Mas (M1: $0,59 \pm 0,13$ U.A., $n=9$ versus M2a: $0,90 \pm 0,15$ U.A., $n=9$; $p=0,1336$) e MrgD (M1: $1,01 \pm 0,13$ U.A., $n=10$ versus M2a: $1,48 \pm 0,33$ U.A., $n=11$; $p=0,2047$).

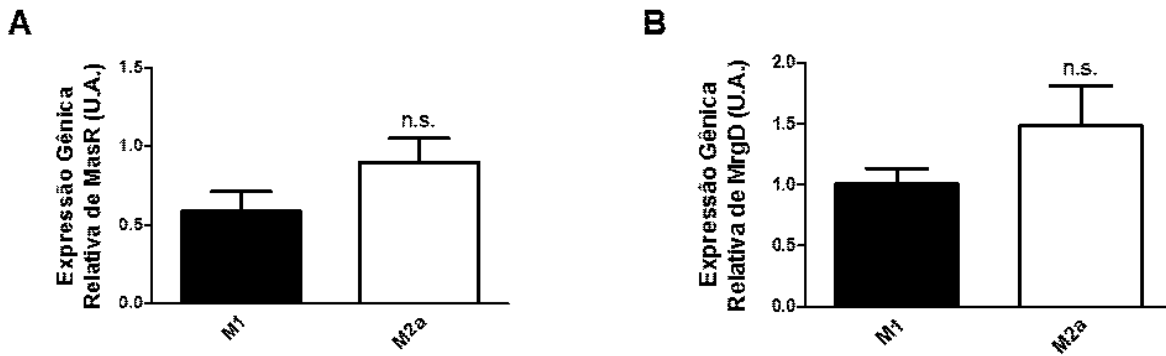
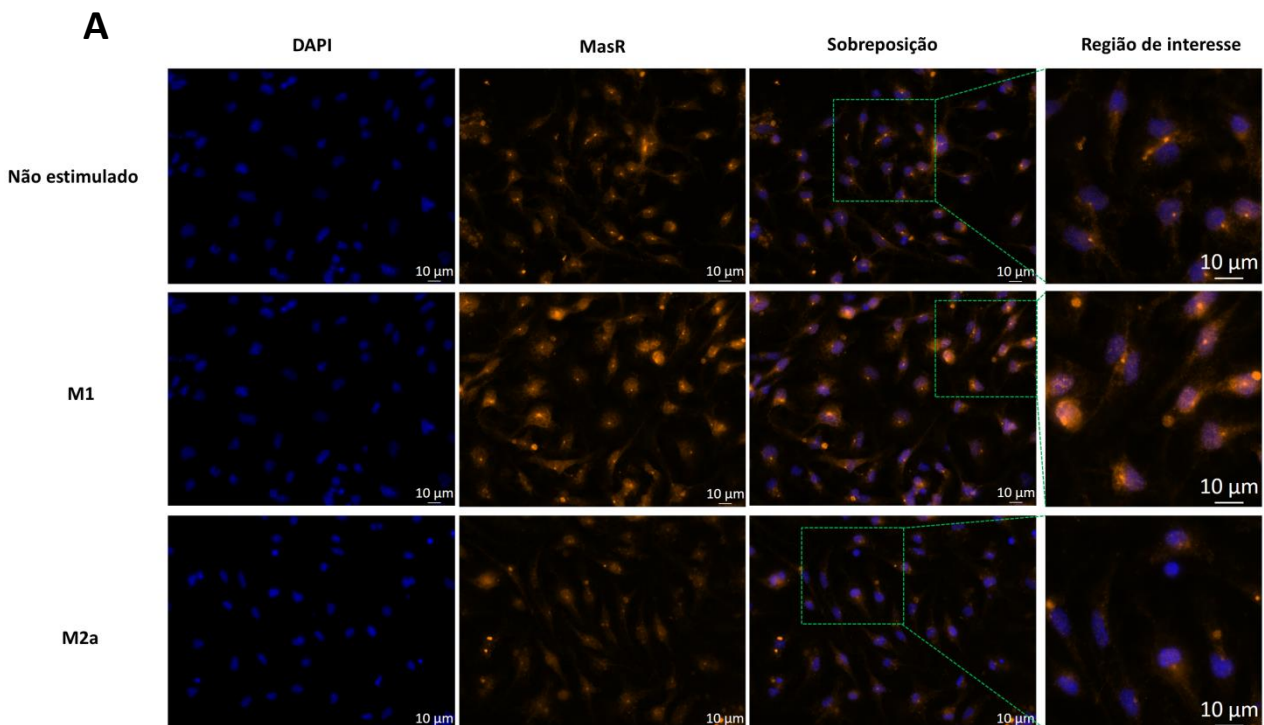


Figura 9: Expressão de RNAm dos genes para os receptores Mas e MrgD nos fenótipos M1 e M2a. (A) Expressão do RNAm referente ao receptor Mas (MasR) e (B) Expressão do RNAm referente ao MrgD. Não se observam diferenças nos níveis de expressão de ambos os receptores entre M1 (barra preta) e M2a (barra branca). n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 9-11 experimentos independentes, com 10^7 células/grupo.

4.1.7.2 Imunofluorescência para os receptores Mas e MrgD

A imunofluorescência para o receptor Mas mostrou que este se encontra distribuído difusamente por toda a extensão da célula nos grupos não estimulado, M1 e M2a (figura 10A). A quantificação da intensidade de fluorescência em U.A. previamente corrigida pelo grupo não estimulado está representada na figura 10B. Nota-se que, assim como observado para a expressão de RNAm do gene para esse receptor, não existem diferenças na expressão da proteína no fenótipo M1 em relação a M2a (M1: $1,17 \pm 0,4027$ U.A., $n=4$ versus M2a: $0,69 \pm 0,04$ U.A., $n=4$; $p=0,3586$).



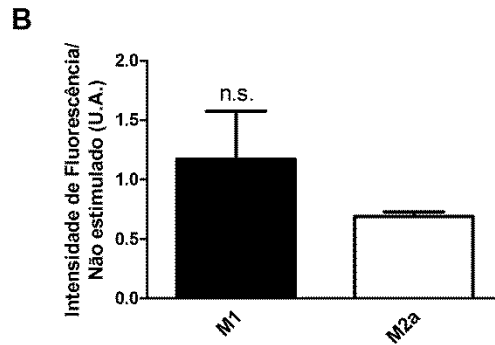
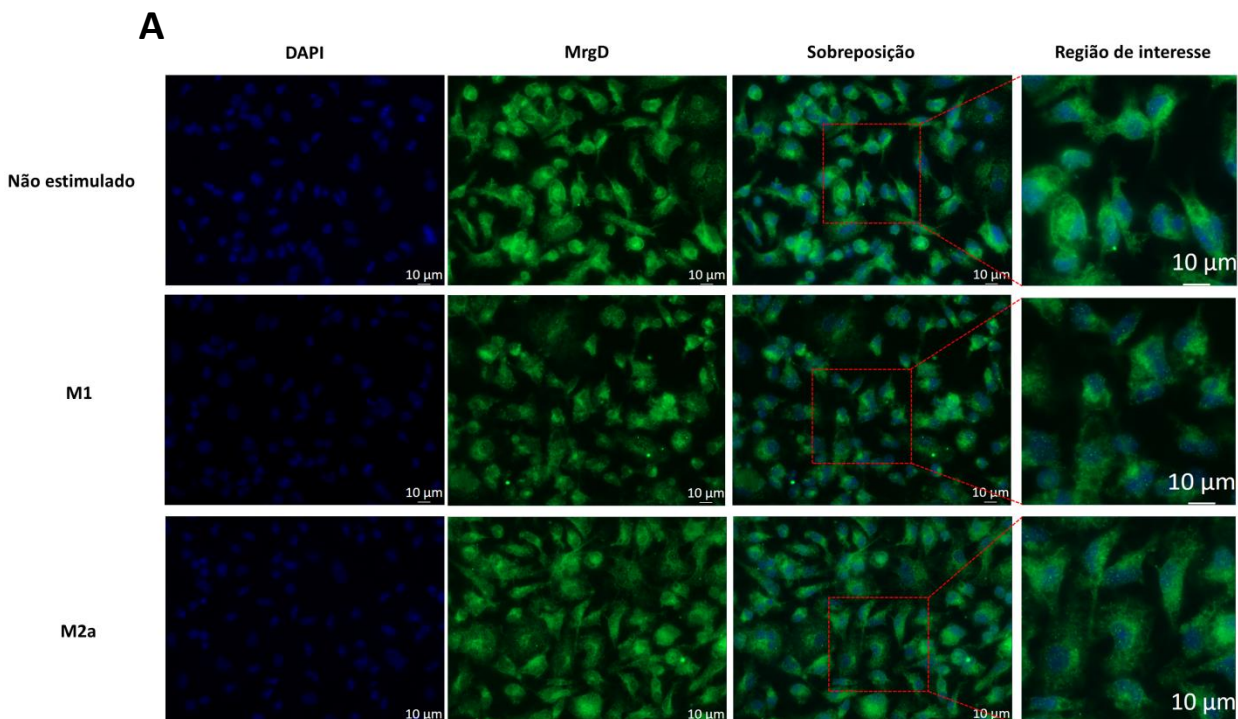


Figura 10: Expressão do receptor Mas em M ϕ MO não estimulados e polarizados aos fenótipos M1 e M2a. (A) Imagens representativas da detecção do receptor Mas por imunofluorescência (laranja) em M ϕ MO dos grupos não estimulado, M1 e M2a, nos quais os núcleos estão corados por DAPI (azul). (B) Quantificação da intensidade de fluorescência para MasR corrigida pelo grupo não estimulado em U.A. nos fenótipos M1 (barra preta) e M2a (barra branca), entre os quais não foi observada diferença de expressão desse receptor. n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes, com 42-50 células/grupo.

A imunofluorescência para o receptor MrgD mostra que este está distribuído difusamente por todo o corpo celular nos grupos não estimulado, M1 e M2a (figura 11A). A figura 11B representa a quantificação da intensidade de fluorescência em U.A. previamente corrigida pelo grupo não estimulado. Nota-se que, assim como observado para a expressão de RNAm do gene para esse receptor, não existem diferenças na expressão da proteína no fenótipo M1 em relação a M2a (M1: $0,59 \pm 0,23$ U.A., $n=4$ versus M2a: $0,57 \pm 0,05$ U.A., $n=4$; $p=0,9553$).



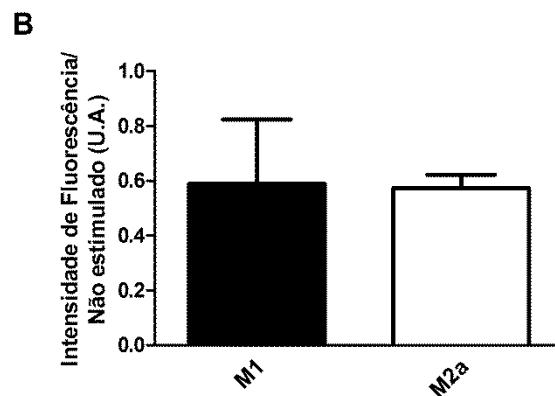


Figura 11: Expressão do receptor MrgD em M ϕ MO não estimulados e polarizados aos fenótipos M1 e M2a. (A) Imagens representativas da detecção do receptor MrgD por imunofluorescência (verde) em M ϕ MO dos grupos não estimulado, M1 e M2a, nos quais os núcleos estão corados por DAPI (azul). (B) Quantificação da intensidade de fluorescência para MasR corrigida pelo grupo não estimulado em U.A. nos fenótipos M1 (barra preta) e M2a (barra branca), entre os quais não foi observada diferença de expressão desse receptor. n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes, com 43-52 células/grupo.

4.2 PARTE 2: Efeito do tratamento de Ang-(1-7) e alamandina em diferentes concentrações sobre a expressão de genes característicos dos fenótipos M1 e M2a

Como mostra a figura 12A, a Ang-(1-7) foi capaz de reduzir a expressão do RNAm de TNF α apenas na concentração de 10^{-7} M [M1: $10,14 \pm 1,28$ U.A., n=16 *versus* M1-Ang-(1-7) 10^{-7} M: $2,66 \pm 0,42$ U.A., n=11; $p < 0,0001$] no fenótipo M1. Por sua vez, no fenótipo M2a, observou-se que ambas as concentrações da Ang-(1-7) a 10^{-8} M e 10^{-6} M evocaram uma diminuição da expressão de RNAm para YM-1 em relação ao controle [M2a: $4,28 \pm 0,58$ U.A., n=12 *versus* M2a-Ang-(1-7) 10^{-8} M: $1,312 \pm 0,79$ U.A., n=4; $p = 0,0184$; e M2a-Ang-(1-7) 10^{-6} M: $1,58 \pm 0,22$ U.A., n=4; $p = 0,0205$]. Por outro lado, a concentração de 10^{-7} M provocou o efeito contrário, aumentando essa expressão [M2a: $4,28 \pm 0,58$ U.A., n=12 *versus* M2a-Ang-(1-7) 10^{-7} M: $23,00 \pm 9,078$ U.A., n=11; $p = 0,0430$] (figura 12B).

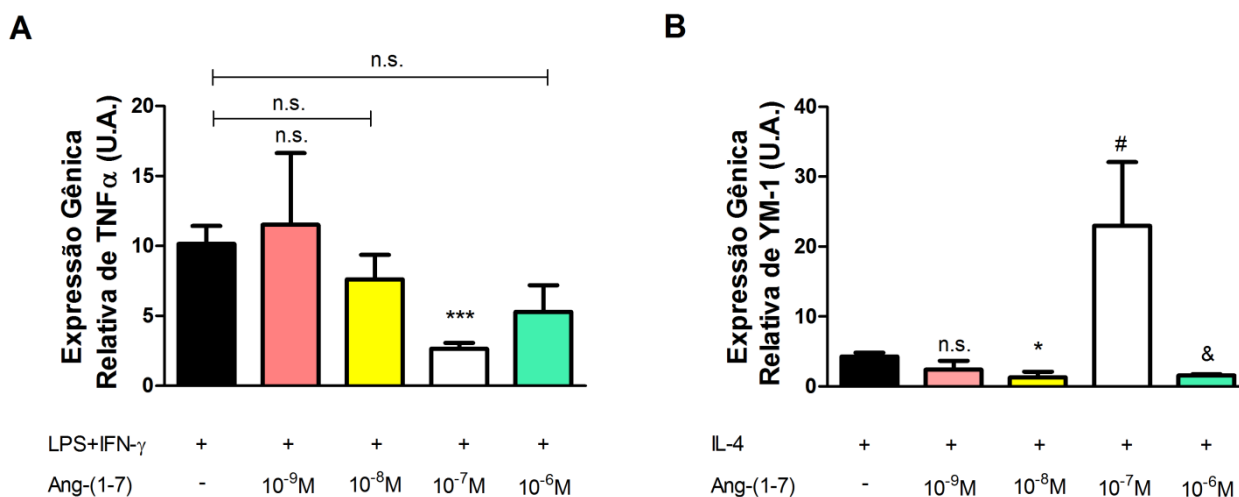


Figura 12: Efeito de diferentes concentrações de Ang-(1-7) em M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a. Foram testadas as seguintes concentrações Ang-(1-7): 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M e 10⁻⁶M. (A) Diminuição do nível de expressão para o RNAm de TNF α (fenótipo M1) foi observada apenas da concentração de 10⁻⁷M em relação ao controle (barra preta). (B) No fenótipo M2a, observa-se que, para as concentrações de 10⁻⁸M e 10⁻⁶M ocorre uma diminuição da expressão de RNAm para YM-1, enquanto uma aumento dessa expressão é notado na concentração de 10⁻⁷M em relação a M2a (barra preta). *** p < 0.001; *, & e #: p < 0.05; n.s. = não significativo em relação ao controle. Sinais de (+) e (-) representam, respectivamente, a administração ou não dos estímulos. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 14-16 experimentos independentes para M1/M2a e 3-11 experimentos independentes para M1-Ang-(1-7)/M2a-Ang-(1-7) nas diferentes concentrações, com 10⁵ células/grupo.

A alamandina foi testada nas mesmas concentrações que a Ang-(1-7) e observou-se que, no fenótipo M1, apenas as concentrações de 10⁻⁷M e 10⁻⁶M foram capazes de provocar diferenças na expressão do transcrito de TNF α em relação ao controle, mas seus efeitos foram opostos [M1: 10,14 \pm 1,28U.A., n=16 *versus* M1-Alamandina 10⁻⁷M: 3,06 \pm 0,67U.A., n=11; p=0,0002; e M1-Alamandina 10⁻⁶M: 19,39 \pm 2,88U.A., n=4; p=0,0054] (figura 13A). No fenótipo M2a, a alamandina foi capaz de diminuir a expressão do RNAm de YM-1 nas concentrações de 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁶M [M2a: 4,28 \pm 0,58U.A., n=12 *versus* M2a-Alamandina 10⁻⁹M: 1,27 \pm 0,38U.A., n=4, p=0,0122; M2a-Alamandina 10⁻⁸M: 0,58 \pm 0,15U.A., n=4; p=0,0029; M2a-Alamandina 10⁻⁶M: 1,12 \pm 0,34U.A., n=4; p=0,0090]. Assim como observado para Ang-(1-7), a concentração de 10⁻⁷M foi a única capaz de aumentar a expressão do transcrito de YM-1 [M2a: 4,28 \pm 0,58U.A., n=12 *versus* M2a-Alamandina 10⁻⁷M: 20,82 \pm 8,07U.A., n=11; p=0,0443] (figura 13B).

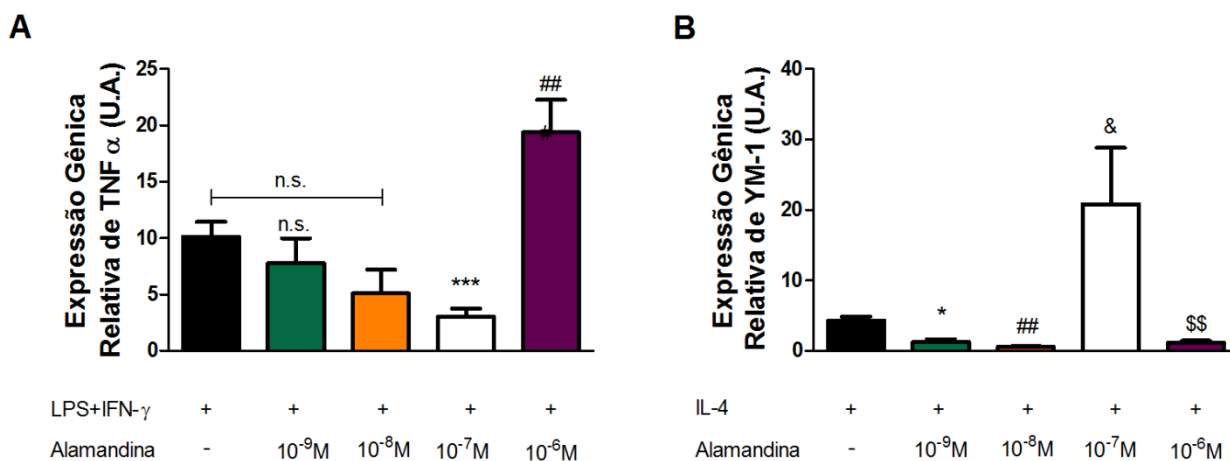


Figura 13: Efeito de diferentes concentrações de alamandina em MφMO polarizados aos fenótipos M1 e M2a. Foram testadas as seguintes concentrações alamandina: 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M e 10⁻⁶M. (A) Observa-se que, para o RNAm de TNFα (fenótipo M1), as concentrações de 10⁻⁷M e 10⁻⁶M provocaram efeitos opostos em relação ao controle (barra preta). Em (B), para o RNAm de YM-1 (fenótipo M2a), todas as concentrações, exceto a de 10⁻⁷M provocaram diminuição na expressão de RNAm dessa proteína. A alamandina a 10⁻⁷M, ao contrário, elevou essa expressão em relação ao controle (barra preta). *** p < 0.001; **, \$\$ e ##: p < 0.01; * e &: p < 0.05; n.s. = não significativo em relação ao controle. Resultados estão expressos em média ± erro padrão da média de 12-16 experimentos independentes para M1/M2a e 3-11 experimentos independentes para M1-Alamandina/M2a-Alamandina em diferentes concentrações, com 10⁵ células/grupo.

Dados os resultados acima, optou-se pela utilização dos peptídeos Ang-(1-7) e alamandina na concentração de 10⁻⁷M para estudar seus efeitos em MφMO polarizados aos fenótipos M1 e M2a.

4.3 PARTE 3: Efeitos da Ang-(1-7) e alamandina a 10⁻⁷M sobre MφMO polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

4.3.1 Efeito do tratamento de Ang-(1-7) a 10⁻⁷M sobre MφMO polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

A figura 14 mostra o efeito de Ang-(1-7) a 10⁻⁷M sobre MφMO polarizados a M1. Observa-se que a Ang-(1-7) foi capaz de diminuir a expressão de RNAm das principais citocinas inflamatórias consideradas marcadoras desse fenótipo em relação ao grupo controle, como TNFα [M1-Ang-(1-7): 2,11 ± 0,35U.A., n=7 *versus* M1: 9,28 ± 1,59U.A., n=12; p=0,0035], CCL2 [M1-Ang-(1-7): 2.096 ± 0.5924U.A., n=7 *versus* M1: 7.533 ± 1.335U.A., n=114; p=0,0119] e IL-1β [M1-Ang-(1-7): 2,33 ± 0,71U.A., n=7 *versus* M1: 6,69 ± 1,07U.A., n=11; p=0,0092]. Para IL-10, não foi observada nenhuma diferença entre o grupo tratado e o

controle [M1-Ang-(1-7): $2,36 \pm 0,36$ U.A., $n=7$ versus M1: $3,33 \pm 0,63$ U.A., $n=12$; $p=0,2869$]. Esse resultado mostra uma diminuição no perfil inflamatório do fenótipo M1 frente ao tratamento com Ang-(1-7) a 10^{-7} M.

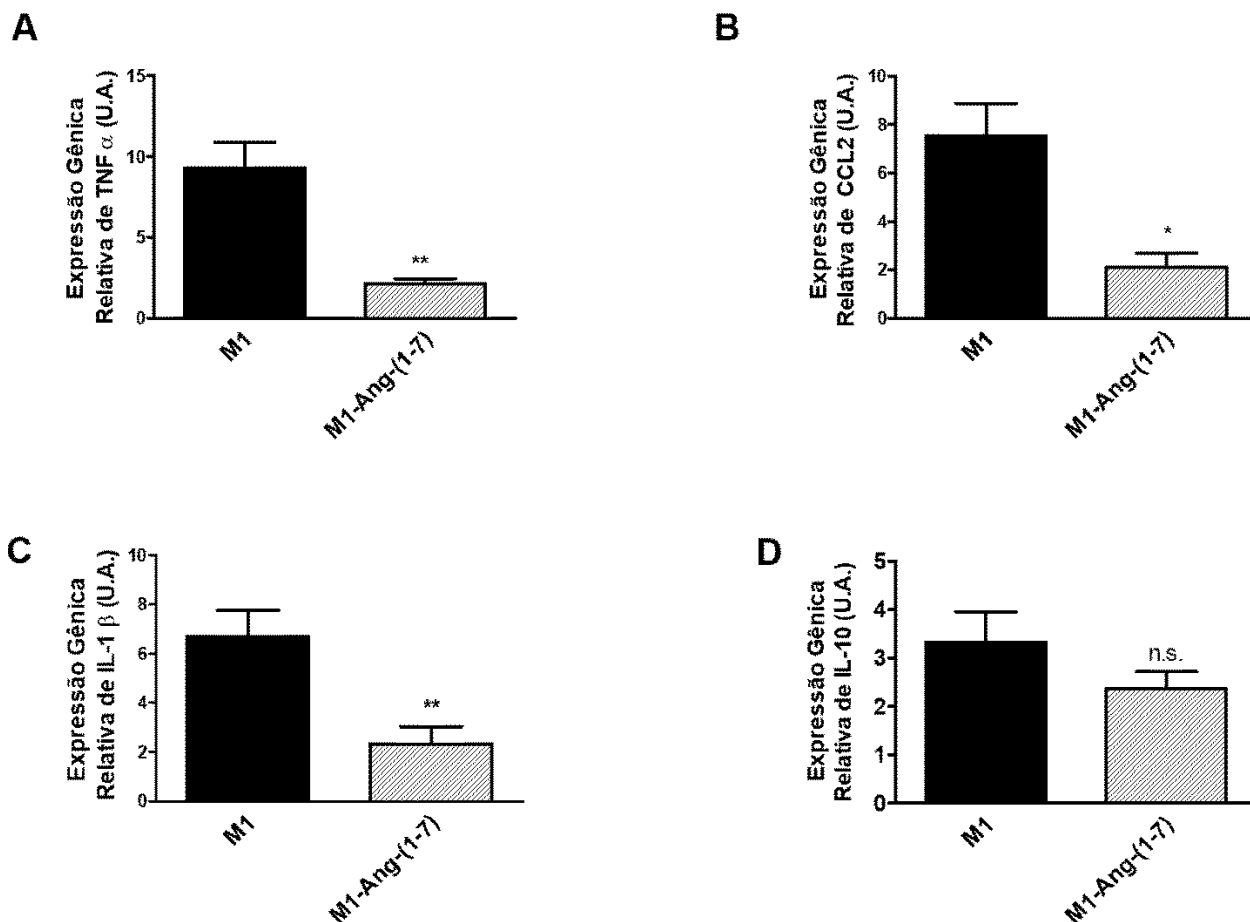


Figura 14: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M1 após o tratamento com Ang-(1-7) a 10^{-7} M. (A-C) Diminuição dos níveis de expressão para os RNAs de TNF α , CCL2 e IL-1 β , respectivamente, no grupo M1-Ang-(1-7) (barra hachurada) em relação a M1 (barra preta). (D) Não foi observada diferença de expressão do RNAm para IL-10 entre M1 e M1-Ang-(1-7). ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$; n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 10-12 experimentos independentes para M1 e 7 experimentos independentes para M1-Ang-(1-7), com 10^7 células/grupo.

A figura 15 mostra o efeito de Ang-(1-7) a 10^{-7} M sobre M ϕ MO polarizados a M2a. Nesse fenótipo, esse peptídeo diminuiu o nível de expressão de RNAm de CD206 [M2a-Ang-(1-7): $1,50 \pm 0,27$ U.A., $n=9$ versus M2a: $2,85 \pm 0,38$ U.A., $n=12$; $p=0,0150$] e aumentou o de YM-1 [M2a-Ang-(1-7): $23,00 \pm 9,08$ U.A., $n=11$ versus M2a: $5,76 \pm 1,14$ U.A., $n=14$; $p=0,0443$]. Não foi observado nenhum efeito sobre a expressão do RNAm de FIZZ-1 [M2a-Ang-(1-7): $21,44 \pm 10,54$ U.A., $n=10$ versus M2a: $26,62 \pm 7,46$ U.A., $n=14$; $p=0,6835$]. Esse resultado sugere que o tratamento com Ang-(1-7) a 10^{-7} M melhora o perfil do fenótipo M2a.

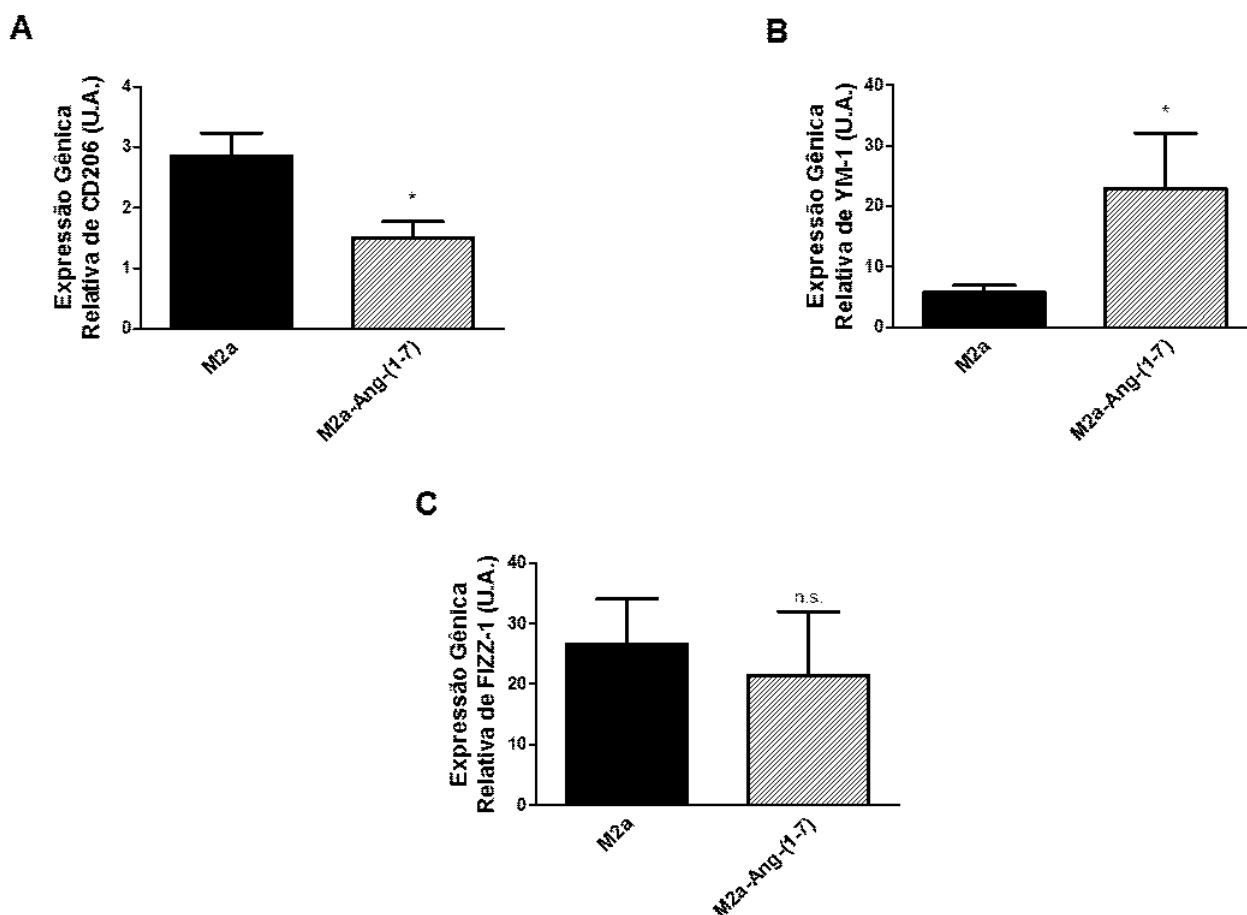


Figura 15: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M2a após o tratamento com Ang-(1-7) a 10^{-7} M. (A) Diminuição da expressão do RNAm de CD206 no grupo M2a-Ang-(1-7) (barra hachurada) em relação a M2a (barra preta). (B) Aumento dos níveis de expressão para o RNAm de YM-1 em M2a-Ang-(1-7) em relação a M2a. (C) Não foi observada diferença de expressão do RNAm de FIZZ-1 no grupo M2a-Ang-(1-7) (barra hachurada) em relação a M2a (barra preta). * $p < 0.05$; n.s.= não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 12-14 experimentos independentes para M2a e 9-11 experimentos independentes para M2a-Ang-(1-7), com 10^7 células/grupo.

4.3.2 Efeito do tratamento de alamandina a 10^{-7} M sobre M ϕ MO polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a

Como mostra a figura 16, o tratamento com alamandina a 10^{-7} M em M ϕ MO do fenótipo M1 diminuiu a expressão do RNAm dos seguintes marcadores estudados em relação ao controle: TNF α (M1-Alamandina: $1,91 \pm 0,27$ U.A., $n=6$ versus M1: $9,23 \pm 1,59$ U.A., $n=12$; $p=0,0053$), IL-1 β (M1-Alamandina: $2,31 \pm 0,52$ U.A., $n=7$ versus M1: $6,69 \pm 1,07$ U.A., $n=11$; $p=0,0071$) e CCL2 (M1-Alamandina: $3,019 \pm 0,7777$ U.A., $n=7$ versus M1: $7,533 \pm 1,335$ U.A., $n=14$; $p=0,0349$). Para IL-10, não foi observada nenhuma diferença entre o grupo tratado e o controle (M1-Alamandina: $2,36 \pm 0,61$ U.A., $n=8$ versus M1: $3,33 \pm 0,63$ U.A., $n=12$; $p=0,3090$). Esse resultado mostra que, assim como o observado para Ang-

(1-7), ocorre uma diminuição do perfil inflamatório do fenótipo M1 frente ao tratamento com alamandina a $10^{-7}M$.

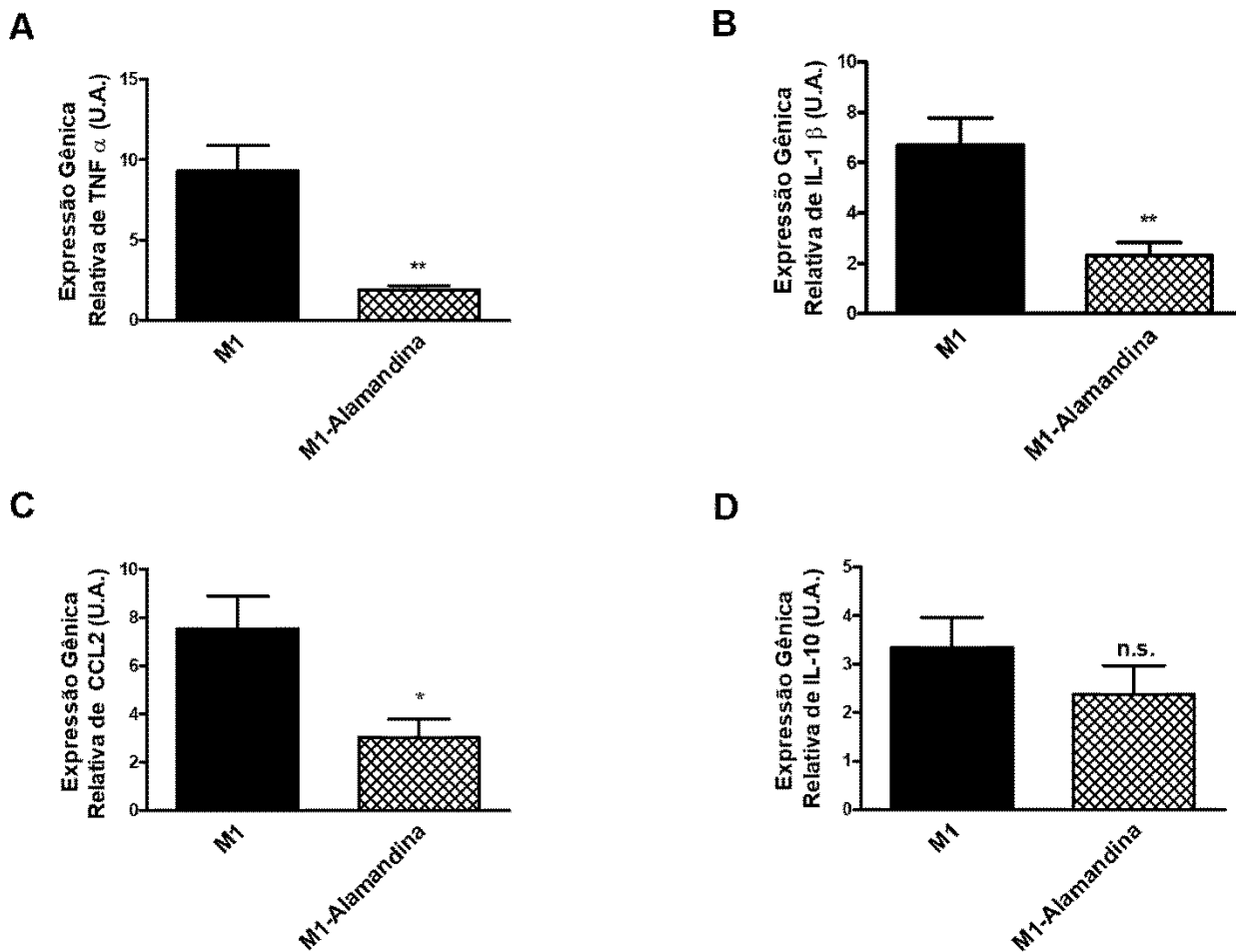


Figura 16: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M1 após o tratamento com alamandina a $10^{-7}M$. (A-C) Diminuição dos níveis de expressão para os RNAs de TNF α , CCL2 e IL-1 β , respectivamente, no grupo M1-alamandina (barra hachurada) em relação a M1 (barra preta). (D) Não foi observada diferença de expressão do RNAm para IL-10 entre M1 e M1-alamandina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 10-12 experimentos independentes para M1 e 6-7 experimentos independentes para M1-alamandina, com 10^7 células/grupo.

Além disso, como mostra a figura 17, o tratamento com alamandina a $10^{-7}M$ não alterou as expressões de RNAm dos marcadores CD206 (M2a-Alamandina: $2,64 \pm 0,57U.A.$, $n=11$ versus M2a: $2,85 \pm 0,38U.A.$, $n=12$; $p=0,7666$) e FIZZ-1 (M2a-Alamandina: $47,30 \pm 21,76U.A.$, $n=11$ versus M2a: $26,62 \pm 7,46U.A.$, $n=14$; $p=0,3339$). No entanto, ele foi capaz de aumentar a expressão do RNAm de YM-1 (M2a-Alamandina: $20,82 \pm 8,07U.A.$, $n=11$ versus M2a: $5,76 \pm 1,14U.A.$, $n=14$; $p=0,0485$). Esse resultado sugere que o tratamento com alamandina a $10^{-7}M$ exerce um efeito sobre um menor espectro de marcadores para o perfil do fenótipo M2a.

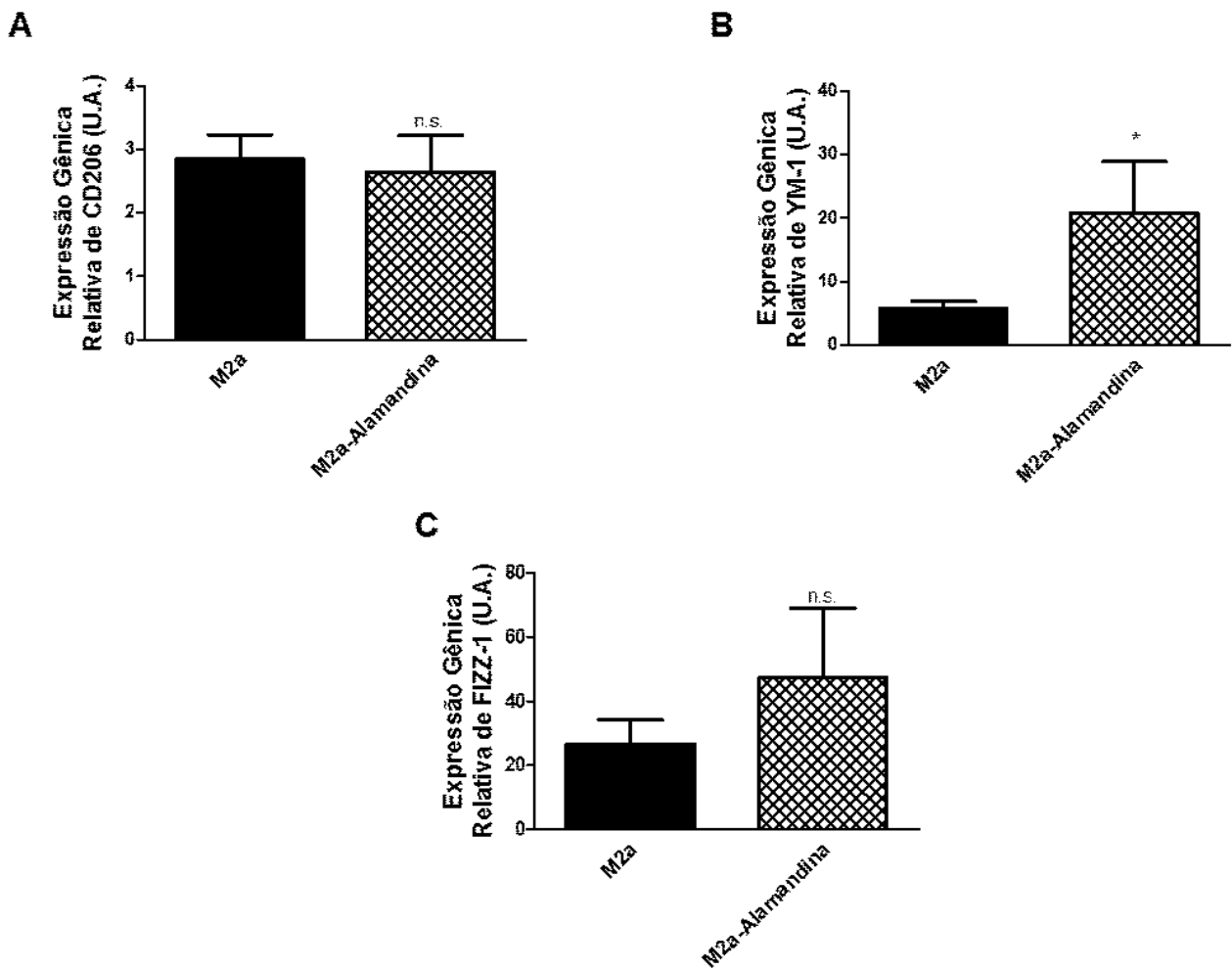


Figura 17: Expressão de RNAm de genes marcadores para o fenótipo M2a após o tratamento com alamandina a $10^{-7}M$. (A e C) Não foi observada diferença de expressão do RNAm de CD206 e FIZZ-1 no grupo M2a-Alamandina (barra hachurada) em relação a M2a (barra preta). (B) Aumento da expressão do RNAm de YM-1 no grupo M2a-Alamandina (barra hachurada) em relação a M2a (barra preta). * $p < 0.05$; n.s. = não significativo. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 12-14 experimentos independentes para M2a e 11 experimentos independentes para M2a-alamandina, com 10^7 células/grupo.

4.4 PARTE 4: Participação dos receptores Mas e MrgD nos efeitos da Ang-(1-7) e alamandina a $10^{-7}M$ sobre M ϕ MO polarizados aos fenótipos M1 e M2a

O antagonismo do receptor Mas por A779 mostrou que este reverte totalmente a diminuição da expressão do RNAm de TNF α observada após o tratamento com o peptídeo Ang-(1-7) [M1-Ang-(1-7): $2,66 \pm 0,42U.A.$, $n=11$ versus M1-Ang-(1-7)-A779: $6,42 \pm 1,27U.A.$, $n=4$; $p= 0,0024$] (figura 18A). O mesmo foi observado para o gene da CCL2 [M1-Ang-(1-7): $3,33 \pm 0,68U.A.$, $n=11$ versus M1-Ang-(1-7)-A779: $7,46 \pm 2,03U.A.$, $n=4$; $p= 0,0247$] (figura 18B). Para IL-1 β , embora tenha havido a mesma tendência de expressão que as demais

citocinas, o tratamento com A779 não foi capaz de reverter de forma significativa os efeitos observados [M1-Ang-(1-7): $2,80 \pm 0,72$ U.A., $n=11$ versus M1-Ang-(1-7)-A779: $3,50 \pm 0,40$ U.A., $n=4$; $p=0,5883$] (figura 18C).

Para o fenótipo M2a, não foi observada reversão, pelo A779, do aumento da expressão do RNAm de YM-1 evocado pelo tratamento com Ang(-7) [M2a-Ang-(1-7): $23,00 \pm 9,08$ U.A., $n=11$ versus M2a-Ang-(1-7)-A779: $7,48 \pm 2,46$ U.A., $n=4$; $p=0,3343$] (figura 18D).

Esses resultados mostram que a diminuição da expressão de citocinas inflamatórias TNF α e CCL2 ocorre via Ang-(1-7)/receptor Mas no fenótipo M1. A diminuição da expressão de RNAm da IL-1 β parece ocorrer independentemente desse receptor, assim como foi observado para o fenótipo M2a, no qual existe um aumento da expressão de YM-1.

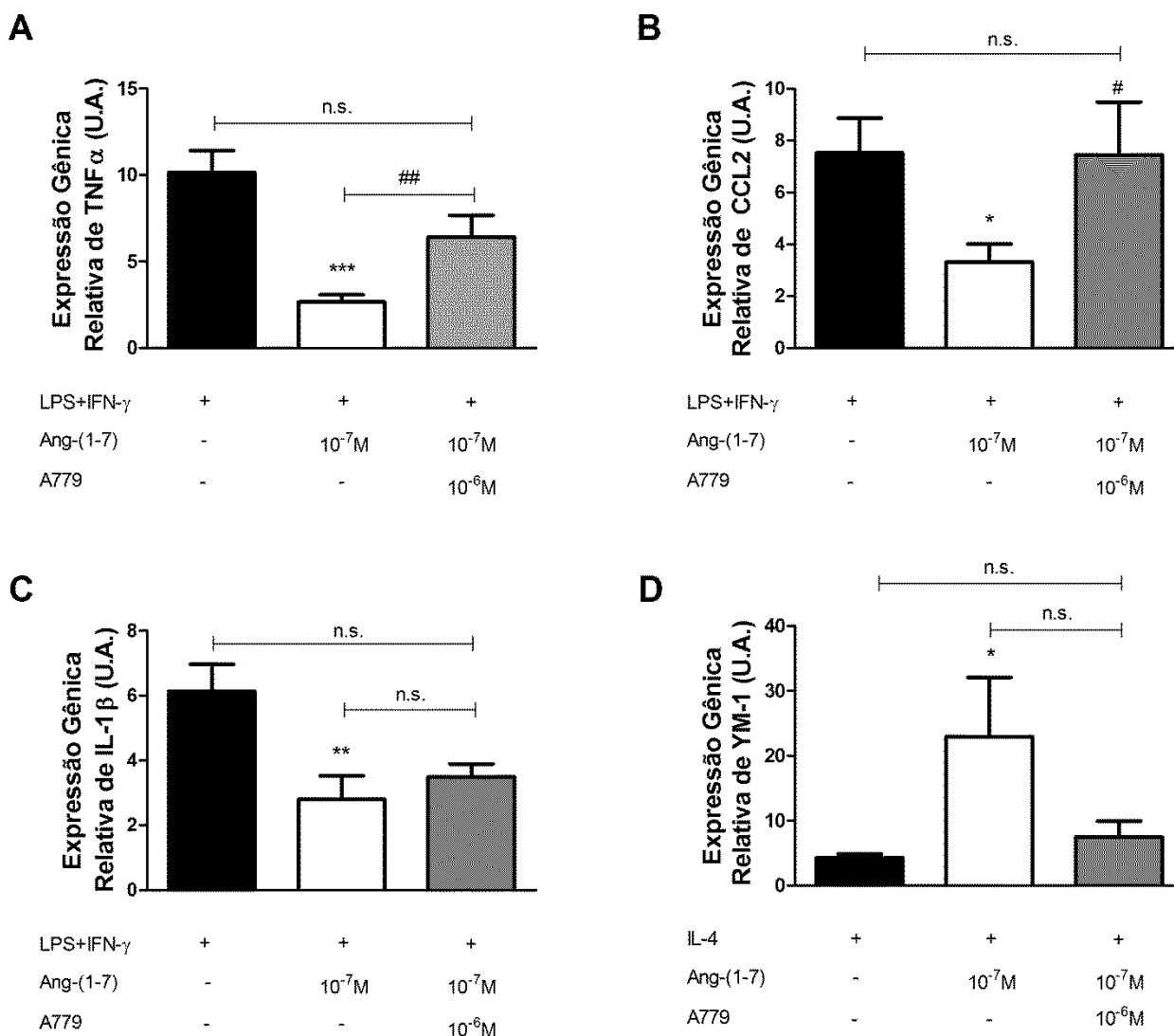


Figura 18: Efeito do antagonismo do receptor Mas com A779 (10^{-6} M) previamente ao tratamento com Ang-(1-7) a 10^{-7} M na expressão de marcadores para os fenótipos M1 e M2a. (A-B) Reversão total da

diminuição da expressão do RNAm de TNF α e CCL2 evocada pela Ang-(1-7) (barra branca) em relação ao controle (barra preta) com antagonismo por A779 (barra cinza). (C) Não foi observada reversão da diminuição da expressão do RNAm de IL-1 β evocada pela Ang-(1-7) (barra branca) em relação ao controle (barra preta) com antagonismo por A779 (barra cinza). (D) Para YM-1, também não foi observada reversão do aumento da expressão do RNAm dessa proteína pelo A779. *** p<0.001; ** e ##: p<0.01; * e #: p<0.05; n.s. = não significativo em relação ao controle. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 14-16 experimentos independentes para M1, 8 experimentos independentes para M1-Ang-(1-7) e 4 experimentos independentes para M1-Ang-(1-7)-A779, com 10⁵ células/grupo.

O antagonismo do receptor MrgD por D-Pro, nos fenótipos M1 e M2a, foi o mesmo observado para o antagonismo do MasR pela A779. O D-Pro reverteu totalmente a diminuição da expressão do RNAm de TNF α observada após o tratamento com o peptídeo alamandina [M1-alamandina: 3,06 \pm 0,67U.A., n=11 *versus* M1-Alamandina-D-Pro: 12,74 \pm 2,10U.A., n=4; p<0.0001] (figura 19A). O mesmo foi observado para o gene da CCL2 [M1-alamandina: 2,07 \pm 0,42U.A., n=11 *versus* M1-Alamandina-D-Pro: 10,11 \pm 4,92U.A., n=4; p= 0.0145] (figura 19B), mas não para IL-1 β [M1-Alamandina: 2,65 \pm 0,39U.A., n=11 *versus* M1-Alamandina-D-Pro: 4,52 \pm 1,55U.A., n=4; p= 0,1109] (figura 19C).

Para o fenótipo M2a, também não foi observada reversão, pelo D-Pro, do aumento da expressão do RNAm de YM-1 evocado pelo tratamento com alamandina [M2a-Alamandina: 20,82 \pm 8,07U.A., n=11 *versus* M2a-Alamandina-D-Pro: 4,74 \pm 0,47U.A., n=4; p= 0,2617] (figura 19D).

Esses resultados mostram que a diminuição da expressão das citocinas inflamatórias TNF α e CCL2 ocorre via alamandina/MrgD no fenótipo M1. Para a IL-1 β , outro marcador de M1 e para YM-1, um dos marcadores de M2a, os efeitos de diminuição e aumento, respectivamente, do RNAm parecem ocorrer independentemente desse receptor.

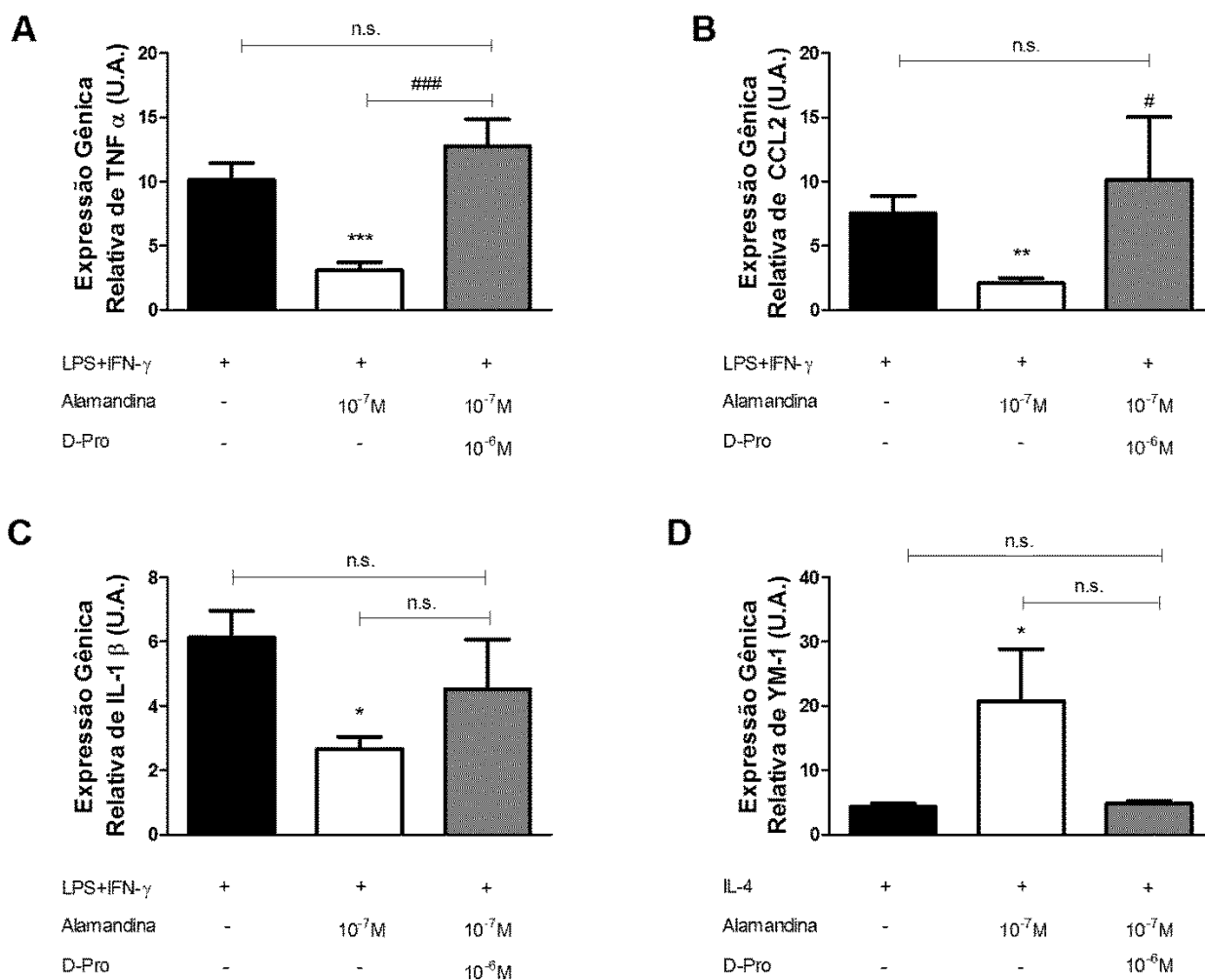


Figura 19: Efeito do antagonismo do receptor MrgD com D-Pro (10^{-6} M) previamente ao tratamento com alamandina a 10^{-7} M na expressão de marcadores para os fenótipos M1 e M2a. (A-B) Reversão total da diminuição da expressão do RNAm de TNF α e CCL2 evocada pela alamandina (barra branca) em relação ao controle (barra preta) com antagonismo por D-Pro (barra cinza). (C) Não foi observada reversão da diminuição da expressão do RNAm de IL-1 β evocada pela alamandina (barra branca) em relação ao controle (barra preta) com antagonismo por D-Pro (barra cinza). (D) Para YM-1, também não foi observada reversão do aumento da expressão do RNAm dessa proteína pelo D-Pro. *** e ###: $p < 0.001$; "" $p < 0.01$; * e #: $p < 0.05$; n.s. = não significativo em relação ao controle. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de 14-16 experimentos independentes para M1, 11 experimentos independentes para M1-Alamandina e 4 experimentos independentes para M1-Alamandina-D-Pro, com 10^5 células/grupo.

5. DISCUSSÃO

A caracterização de M ϕ MO de camundongos FVB/N polarizados *in vitro* aos fenótipos M1 e M2a mostrou que, assim como em outras linhagens, como C57BL/6, essas células possuem uma assinatura marcante e bem conservada (JABLONSKI et al., 2015). Conclui-se, nesse ponto, que as diferenças genéticas entre as linhagens não influenciam no processo de ativação de macrófagos aos fenótipos M1 e M2a. De qualquer forma, a caracterização do modelo se faz necessária, uma vez que, apesar de as linhagens possuírem o mesmo conjunto de genes, diferentes interações entre sequências promotoras, variantes alélicas e potenciadores levam a diferenças fenotípicas, ou seja, a diferentes respostas induzidas pela variação genética (SCHADT et al., 2003; MARQUES et al., 2011).

A morfologia celular tem sido apontada como um indicador do estado funcional da célula (FOLKMAN; MOSCONA, 1978) e acredita-se que interações com diferentes componentes – entre eles, o substrato e o meio extracelular – sejam importantes na mediação de efeitos induzidos por ela (MCWORTHER et al., 2013). Pelegrin; Surprenant (2009) descreveram a morfologia de macrófagos peritoneais murínicos polarizados *in vitro* por 4 horas aos fenótipos M1 (LPS e IFN- γ) e M2 (IL-4) através de contraste de fase e imunofluorescência, sugerindo que a análise morfológica também possa contribuir para a caracterização dessas células *in vitro*. Foi demonstrado por estes autores que macrófagos com fenótipos próximos a M1 possuíam muitos processos lamelares e que a marcação da F-actina era bem distribuída por todo o citoplasma, mas estava ausente nos filopódios, os quais se apresentavam alongados. Já macrófagos com fenótipo próximo a M2 apresentaram um aspecto morfológico mais arredondado e com a F-actina presente principalmente próxima ao núcleo, tendo assim, morfologia semelhante ao grupo não estimulado. Pelegrin; Surprenant (2009) também analisaram as alterações da área celular frente à polarização *in vitro*, mostrando que o fenótipo M1 apresentou área celular maior que o fenótipo M2. McWorther et al. (2013) demonstraram, em M ϕ MO polarizados a M1 (LPS e IFN- γ) e M2 (IL-4 e IL-13) por 24 horas, que essas células também apresentam diferenças morfológicas, sendo o fenótipo M1 mais arredondado; e o M2, mais alongado. Além disso, esses autores sugerem que o alongamento da forma celular leva a célula a adquirir um fenótipo próximo de M2 ao evocar uma sinergia entre uma menor expressão e secreção de produtos inflamatórios e a capacidade contrátil do citoesqueleto celular. Contrariamente a esses dados, nenhuma diferença morfológica no que concerne ao diâmetro, área e distribuição de F-actina foi encontrada entre os grupos estudados no presente trabalho. Da mesma forma, Porcheray et al. (2005), através da coloração May-Grünwald-Giemsa, analisaram a morfologia de M ϕ MO humanos polarizados a M1 e a M2 utilizando diferentes estímulos pro-

(fator estimulantes de colônias de granulócitos-monócitos, IFN- γ , TNF α) e anti-inflamatórios (M-CSF, IL-4, IL-10). Esses autores observaram que a morfologia celular não estava associada a nenhum dos estímulos usados, concluindo que M1 e M2 não apresentam uma morfologia particular, sendo necessário o uso de marcadores específicos para cada fenótipo para se estudar os aspectos morfológicos relacionados ao processo de polarização *in vitro*. Nota-se que, na tentativa de caracterizar os macrófagos morfológicamente, diferentes protocolos, estímulos e tempos estão descritos na literatura. Isso contribui para que este seja um terreno escorregadio, dificultando a compreensão do papel da morfologia na função celular.

No presente trabalho, o fenótipo M1 pôde ser caracterizado pela expressão diferencial do transcrito das citocinas CCL2, TNF α e IL-1 β ; e pela enzima iNOS. A CCL2 é uma das principais responsáveis pelo recrutamento de células imunes para sítios de inflamação e lesão (MARQUES et al., 2011). Já o TNF α funciona tanto um sinal de ativação como um produto secretado por macrófagos do fenótipo M1 (MOSSER; ZHANG, 2008; PARAMESWARAN; PATIAL, 2010) e a IL-1 β foi recentemente identificada como mediadora do processo de fibrose e estimuladora de produção de outras citocinas inflamatórias (MURRAY; WYNN, 2011). Essas duas citocinas – TNF α e IL-1 β - participam da ativação de vários mecanismos antimicrobianos, além de serem importantes mediadores em várias doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (MURRAY; WYNN, 2011; MOSSER, 2003). De fato, as alterações na expressão gênica induzidas por LPS e INF- γ em macrófagos do fenótipo M1 envolvem vias intracelulares que culminam em maior expressão desses marcadores (LAWRENCE; NATOLI, 2011). O LPS interage com o receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4) localizado na membrana celular e gera duas cascatas de sinalização. A primeira é dependente da proteína de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (em inglês, *myeloid differentiation primary response protein 88*, MyD88) e permite que fatores de transcrição como o fator nuclear κ B (em inglês, *nuclear factor κ B*, NF- κ B) sejam ativados e se liguem a regiões promotoras de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF α e CCL2. A segunda cascata ativada pelo TLR4 envolve a proteína de domínio TIR contendo adaptador de indução de interferon β (em inglês, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon β* , TRIF) e a indução da produção de interferons do tipo I, sem os quais a produção de citocinas pró-inflamatórias fica prejudicada (LU et al., 2008). O IFN- γ , por sua vez, se liga ao seu receptor na membrana celular e leva à fosforilação da proteína quinase Janus transdutora de sinais e ativadora de transcrição (em inglês, *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*, JAK-STAT) e à dimerização da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição (em inglês, *signal transducer and activator of transcription*, STAT) 1 previamente fosforilada. Isso permite a interação entre o dímero de

STAT1 e sequências gama-ativadas presentes nas regiões promotoras de genes codificadores para, por exemplo, iNOS (LAWRENCE; NATOLI, 2011).

As alterações na expressão gênica induzidas por IL-4 em macrófagos do fenótipo M2 envolvem a interação dessa interleucina com a subunidade alfa do seu receptor (IL-4R α), ativando cascatas de sinalização intracelulares via JAK-STAT6 e fosfatidilinositol quinase-3 (em inglês, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, PI3K). Isso culmina na regulação da expressão dos principais marcadores para esse fenótipo: CD206, FIZZ-1, YM-1 e Arg1 (TAKEDA et al., 1996; LAWRENCE; NATOLI, 2011). A função do CD206 em macrófagos ainda não é totalmente compreendida, mas esse receptor parece estar envolvido na apresentação de antígenos, resolução de processos inflamatórios e fibrose (RÖSZER, 2015). Por sua vez, ambos YM-1 e FIZZ-1 são produzidas em quadros de infecção parasitária em macrófagos murínicos, além de estarem envolvidas em alergias e outros eventos (RÖSZER, 2015). Ruffell et al. (2009) demonstraram também que outra via de sinalização, envolvendo a proteína ligadora de elemento responsivo ao AMP cíclico (em inglês, *cAMP-responsive element-binding protein*, CREB) e o fator ligadora de potenciador/CCAAT β (em inglês, *CCAAT/enhancer-binding protein β* , C/EBP β), também mediam o efeito de IL-4 via seu receptor em macrófagos do fenótipo M2.

O metabolismo de L-arginina em macrófagos dos fenótipos M1 e M2 tem sido bastante utilizado na literatura como método para diferenciar um fenótipo do outro (RATH et al., 2014). Em macrófagos do fenótipo M1, a expressão da enzima iNOS pode ser induzida por uma série de estímulos, como citocinas inflamatórias (IL-1 β , IFN- γ e TNF α) e produtos microbianos (LPS) (RATH et al., 2014). Através da ação da iNOS, a L-arginina é metabolizada em L-citrulina e NO (MOSSER; ZHANG, 2008), que são produtos importantes em vias intracelulares inflamatórias e microbicidas não apenas nessas células, mas também em outros tipos celulares (RATH et al, 2014). Por outro lado, em macrófagos M2, Edwards et al. (2006) relataram que existe pouca ou nenhuma atividade de iNOS quando comparados a M1.

Além disso, a L-arginina é substrato para outra enzima, a arginase, que a hidrolisa em ureia e L-ornitina (PERNOW; JUNG, 2013), produtos importantes para o crescimento celular, formação de colágeno e reparo tecidual (MOSSER, 2003; RATH et al., 2014). Essa enzima existe em duas isoformas - arginase-1 e arginase-2 - que apresentam não apenas localizações intracelular e tecidual diferentes, mas também possuem suas atividades estimuladas por estímulos opostos em macrófagos polarizados (PERNOW; JUNG, 2013). Como relatado por Edwards et al. (2006), Khallou-Laschet et al. (2010) e Pourcet; Pineda-Torra (2013), macrófagos ativados ao fenótipo M1 apresentam maior expressão da isoforma 2, enquanto aqueles ativados ao fenótipo M2 expressam

mais a isoforma 1. No entanto, a presença dessa enzima não é um marcador confiável para macrófagos porque ela pode ser também expressa por outros fenótipos (MOSSER; Zhang, 2008). De fato, no presente trabalho, não foi possível distinguir os M ϕ MO polarizados *in vitro* ao fenótipo M1 e M2a baseando-se na expressão do transcrito para as isoformas de arginase.

Ainda no que se relaciona ao metabolismo da L-arginina em macrófagos, o conteúdo de NO foi avaliado indiretamente pelo método de Griess; e as EROs, por fluorescência de DHE. Observou-se que, apesar da transcrição do gene para iNOS ser bastante marcante no fenótipo M1, a produção de NO – e, conseqüentemente, de NO₂⁻ - não ocorre nesse fenótipo de forma expressiva em relação a M2a. Logo, acredita-se que o NO₂⁻ detectado pelo método de Griess seja decorrente da atividade de uma ou de ambas isoformas constitutivas da NOS – endotelial e neuronal - não avaliadas neste trabalho. De forma semelhante, não ocorre maior produção de EROs no fenótipo M1, logo, acredita-se que a fluorescência detectada pela sonda em ambos os fenótipos seja proveniente do próprio metabolismo oxidativo da célula. Esses resultados vão contra a ideia de que macrófagos polarizados a M1 produzem grandes quantidades de NO via iNOS e EROs necessárias para suas atividades microbidas (MOSSER; ZHANG, 2008). Uma das hipóteses para a inexistência de uma maior produção de NO e EROs no fenótipo M1 no presente trabalho pode ser a ocorrência de regulação pós-transcricional por ubiquitinação e fosforilação que alteram a estabilidade do RNAm da iNOS, marcando-a para degradação via complexo ubiquitina-proteassoma e, assim, não permitindo que esta seja traduzida e exerça sua atividade (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

No presente estudo, utilizou-se o gene da IL-10 para caracterizar o fenótipo M2a. A IL-10 é uma interleucina regulatória muito importante, limitando e restringindo a resposta inflamatória de células polimorfonucleares (LIU et al., 2007). Ao contrário do esperado, o fenótipo M1 apresentou maior expressão do transcrito para esse gene em relação a M2a. Observa-se, na literatura, que o tratamento de macrófagos murínicos com IL-10 leva à polarização dos macrófagos ao fenótipo M2, mais especificamente, M2c (MANTOVANI et al., 2004) e que, associada à IL-4, ocorre uma potencialização das características desse fenótipo devido à indução da expressão do receptor IL4R α (MAKITA et al., 2014). Além disso, Deng et al. (2012) demonstraram que, dada a plasticidade dos macrófagos, o tratamento das células com IL-10 em músculos de camundongos C57BL/6J leva à conversão do fenótipo M1 a M2a para promover regeneração e crescimento.

Porém, no que concerne à expressão de RNAm para IL-10 após estimulação dos macrófagos ao fenótipo M1 com LPS e IFN- γ ; e ao M2a com IL-4, observa-se que existem dados apontando para a ativação de vias intracelulares diferentes com o mesmo

resultado final. No caso da polarização ao fenótipo M1, a interação do LPS com a proteína do grupo de diferenciação 14 (em inglês, *cluster of differentiation 14*, CD14) e o TLR4 favorece a cascata de sinalização envolvendo a fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (em inglês, *mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) p38, ERK e JNK, para ativação dos fatores de transcrição Sp-1 e STAT3, o que leva à transcrição de IL-10 em macrófagos alveolares humanos e da linhagem RAW 264.7 (LIU et al., 2006; CHANTEUX et al., 2007; CHUNG et al., 2007). Por outro lado, a ação da IL-4 com seu receptor também pode levar à alguma expressão de IL-10, provavelmente, via JAK-STAT6 (SCHEBESCH et al., 1997; MOSSER, 2003; EDWARDS et al., 2006; TUGAL; LIAO; JAIN, 2013). No modelo descrito no presente trabalho, M ϕ MO polarizados ao fenótipo M1 corroboram o que já está descrito para a indução da transcrição nesse fenótipo nos trabalhos anteriormente citados, mostrando que a combinação LPS+IFN γ é mais eficiente na estimulação da transcrição dessa interleucina que a IL-4 utilizada na polarização do fenótipo M2a.

Uma vez que os macrófagos expressam vários componentes do SRA, como a ECA, Ang II, AT1, AT2, ECA2, Ang-(1-7) e MasR (OKAMURA et al., 1999; TATCHER et al., 2011; SOUZA; COSTA-NETO, 2012; RAFATIAN et al., 2013; HAMMER et al., 2016); e possuem importante papel na fisiopatologia dos sistemas orgânicos (MEDBURY; WILLIAMS; FLETCHER, 2014), o estudo das alterações do SRA nessas células torna-se um ponto importante para a compreensão dos mecanismos que afetam seus fenótipos e funções. A expressão do transcrito do receptor Mas, com o qual a Ang-(1-7) preferencialmente interage, pode ser induzida durante a polarização *in vitro*, como foi mostrado por Souza; Costa-Neto (2012). Por meio de qPCR, a expressão do transcrito para esse receptor após 3, 6, 9 e 12 horas de estimulação com LPS *in vitro* de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C7BL/6j foi analisada e observou-se que ocorre um aumento dessa expressão no tempo de 3 horas. Entretanto, no presente trabalho, não foram observadas diferenças de expressão, tanto ao nível do transcrito quanto ao nível da proteína após quatro horas de estimulação com LPS e IFN- γ . O mesmo resultado foi encontrado por Hammer et al. (2016), após estimulação de M ϕ MO isolados da mesma linhagem por 48 horas utilizando LPS e IFN- γ . Esses autores, ainda, não observaram alteração da expressão de MasR ao nível de transcrito e de proteína, entre os fenótipos M1 e M2a. Uma das hipóteses para essa diferença entre os resultados pode ser a utilização de IFN- γ induzindo e inibindo diferentes subconjuntos de genes induzidos pelo LPS, como já descrito para citocinas inflamatórias (KOPYDLOWSKI et al., 1999), além da duração dos estímulos em si – que foi diferente entre os trabalhos citados –, e a linhagem de camundongos utilizada. Além disso, o presente trabalho mostrou, pela primeira vez, que macrófagos murínicos

também expressam o receptor MrgD e, assim, respondem ao seu principal agonista endógeno, a alamandina. A expressão desse receptor em macrófagos já havia sido sugerida por Habiyakare et al. (2014) em um modelo de aterogênese em coelhos, no qual foi observada uma rara colocalização entre o MrgD e essas células quando comparadas a células endoteliais e do músculo liso em placas ateroscleróticas por imuno-histoquímica. Assim como para o receptor Mas, a polarização de M ϕ MO aos fenótipos M1 e M2a, por um período de 4 horas, não afetou a expressão desse receptor no presente estudo.

O envolvimento do eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas na redução da resposta inflamatória de macrófagos polarizados a M1 já havia sido demonstrada *in vitro* por Thomas et al. (2010) e Souza; Costa-Neto (2012). Thomas et al. (2010) observaram o aumento da expressão dos transcritos das citocinas TNF α , CCL2 e IL-6 evocado pela estimulação *in vitro* com LPS em M ϕ MO da linhagem C57BL/6j era ampliado com a deleção do gene para ECA2. Souza; Costa-Neto (2012), por sua vez, utilizando macrófagos peritoneais da mesma linhagem, observaram que o tratamento dessas células com Ang-(1-7) (10^{-6} M) seguido da estimulação com LPS prevenia o aumento da expressão de RNAm de TNF α e IL-6 causado por este estímulo. Os mesmos resultados *in vitro* foram relatados por Souza et al. (2014) com a utilização de ELISA para detecção dessas citocinas. Esses autores também demonstraram que a ação anti-inflamatória da Ang-(1-7) era reproduzível *in vivo* em um modelo murínico de endotoxemia por LPS, no qual o pré-tratamento com esse peptídeo diminuiu a secreção de interleucinas como IL-6 e IL-12, sem alterar os níveis de TNF α e da quimiocina motivo (C-X-C) ligante 2. Além disso, em um modelo de aterosclerose em camundongos com deleção para a apolipoproteína E (ApoE $^{-/-}$), ainda em estágio precoce da doença, o uso do análogo da Ang-(1-7), AVE 0991, diminuiu a população de M1 *in vivo* (SKIBA et al., 2016) no tecido adiposo perivascular (PVAT). Esses mesmos autores verificaram o efeito direto do AVE 0991 (10^{-6} M) sobre a linhagem de monócitos THP-1, observando que esse análogo, por meio da interação com o receptor Mas, foi capaz de diminuir a expressão do transcrito de citocinas pró-inflamatórias com participação do receptor Mas após estimulação com LPS e IFN- γ por 24 horas. No presente trabalho, confirmamos os achados de Souza; Costa-Neto (2012) e Thomas et al. (2010) de que a Ang-(1-7) evoca uma diminuição na expressão do transcrito de TNF α e CCL2, além do mesmo ter sido observado para IL-1 β . Por sua vez, a ausência de alteração da expressão de RNAm para IL-10 após o tratamento com Ang-(1-7) (10^{-7} M) no presente trabalho, apesar de essa citocina ser ativada pela estimulação com LPS e IFN- γ , é interessante, uma vez que quinases da família Src, recentemente associadas ao efeito anti-inflamatório da Ang-(1-7) em macrófagos (SOUZA; COSTA-NETO, 2012), atuam em STATs, como a STAT3 –

importante para a transcrição de IL-10 (RAM; IYENGAR, 2001; LIU et al., 2006; CHANTEUX et al., 2007; CHUNG et al., 2007).

No presente estudo, o antagonismo farmacológico do receptor Mas pelo A779 (10^{-6} M) reverteu a redução da resposta inflamatória do TNF α causada pela Ang-(1-7) (10^{-7} M) - como havia sido previamente mostrado por Souza; Costa-Neto (2012) -, mas também de CCL2. Isso mostra que os efeitos observados no fenótipo M1 ocorrem por uma via intracelular ativada por esse receptor. Além disso, Souza; Costa-Neto (2012) mostraram que a redução da expressão do transcrito das citocinas inflamatórias TNF α e IL-6 ocorre via Ang-(1-7)/receptor Mas pela diminuição da fosforilação de quinases da família Src, que acredita-se estar envolvida em respostas imunes inflamatórias. Essa família, de fato, é um dos elementos-chave na função de macrófagos por meio da regulação da sinalização intracelular (ABRAM; LOWELL, 2008). Esses autores identificaram e confirmaram o envolvimento das quinases Lyn, Lck e Fgr na resposta anti-inflamatória mediada pelo receptor Mas em macrófagos. Outro trabalho demonstrou que a Ang-(1-7) (10^{-7} M) tem o mesmo efeito em micróglia de ratos recém-nascidos e que isso ocorreria pela inibição da via ERK/NF- κ B, dado que a Ang-(1-7) evocou uma diminuição da expressão das subunidades ativas de NF- κ B (LIU et al., 2016). A importância de quinases Src em vias envolvendo o NF- κ B foi demonstrada por Lee et al. (2007) em um modelo de injúria pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos, na qual a inibição de Src levou à inibição da ativação de NF- κ B mediada por LPS. O A779 (10^{-6} M), no entanto, não foi capaz de reverter a diminuição de expressão observada após o tratamento com Ang-(1-7) (10^{-7} M) para IL-1 β no presente trabalho. No entanto, Skiba et al. (2016) demonstraram que o efeito sobre a expressão de do RNAm de IL-1 β evocados pelo AVE 0991 (10^{-6} M) é revertido pelo A779 quando utilizado em concentração 5 vezes maior. Isso poderia explicar por que não foi observado nenhum efeito da Ang-(1-7) sobre essa citocina no presente trabalho, mas não exclui a possibilidade da existência de outros mecanismos estarem envolvidos nesse fenômeno.

Até o momento, não existem dados na literatura mostrando a influência da Ang-(1-7) propriamente dita sobre o perfil anti-inflamatório de macrófagos M2a. Contudo, Skiba et al. (2016), avaliando o papel *in vivo* do AVE 0991 PVAT de camundongos ApoE^{-/-} no início da aterosclerose, demonstraram por citometria de fluxo que a população de macrófagos com fenótipo M2 não era afetada por ele. Esse resultado foi corroborado por estes autores com a expressão de RNAm dos marcadores CD206 e CD209 em células THP-1 polarizadas *in vitro*, apesar de não terem sido utilizados estímulos específicos para a polarização ao fenótipo M2 nesse trabalho (SKIBA et al. 2016). Além disso, Hammer et al. (2016) demonstraram que a deleção do receptor Mas em camundongos C57BL/6J provoca uma diminuição nos níveis de RNAm do marcadores para M2a em macrófagos esplênicos, YM-1,

FIZZ-1, CD206 e a lectina galactose N-acetilgalactosamina específica 2, sugerindo que, nesse fenótipo, o eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas também possa ser importante para a regulação da função celular. De forma contrária, o uso do AVE 0991 (10^{-7} M) em macrófagos polarizados *in vitro* com IL-4 e IL-13 aumentou a expressão do transcrito de todos os marcadores citados anteriormente (HAMMER et al., 2016). O presente trabalho demonstrou que, dentre os genes analisados – YM-1, FIZZ-1 e CD206 -, apenas as expressões de RNAm de CD206 e YM-1 foram alterados, respectivamente, diminuindo e aumentando após o tratamento com a Ang-(1-7) (10^{-7} M). Essas diferenças podem ser devidas ao *background* genético do animal utilizado, bem como ao próprio desenho experimental. O antagonismo do receptor Mas em macrófagos com fenótipo M2a por A779 (10^{-6} M) não reverteu o aumento da expressão do transcrito de YM-1, sugerindo que outras vias independentes desse receptor geram o efeito observado.

O presente trabalho relatou, de forma inédita, os efeitos da alamandina (10^{-7} M) sobre os fenótipos M1 e M2a. A sequência da alamandina difere daquela da Ang-(1-7) por um único aminoácido, devido à descarboxilação enzimática do aspartato para alanina (LAUTNER; VILELLA; FRAGA-SILVA et al., 2013). No entanto, a alamandina não se liga ao receptor Mas (LAUTNER; VILELLA; FRAGA-SILVA et al., 2013). Mesmo com essas diferenças, o tratamento com alamandina dos M ϕ MO polarizados a M1 e M2a provocou os mesmos efeitos que a Ang-(1-7) via receptor Mas em macrófagos do fenótipo M1, bem como o antagonismo de ambos os receptores Mas e MrgD nessas células pelo D-Pro (10^{-6} M). Em macrófagos do fenótipo M2a, a alamandina evocou o mesmo efeito que a Ang-(1-7) em YM-1, aumentando a expressão de seu transcrito; mas não houve diferenças nos outros marcadores. Da mesma forma, como o antagonismo farmacológico do receptor MrgD pelo D-Pro não reverteu o efeito observado, sugerindo que esse aumento também possa ocorrer por outros mecanismo independentemente do receptor MrgD. Até o momento, não existem outros dados na literatura sobre a influência desse peptídeo nessas células, tendo sido mostrado apenas que alguns efeitos biológicos evocados pela alamandina são semelhantes aos da Ang-(1-7) em outros modelos experimentais (LAUTNER; VILELLA; FRAGA-SILVA et al., 2013). Acredita-se, assim, que as vias de sinalização intracelulares ativadas pelos receptores Mas e MrgD, nesse ponto, possam ser semelhantes.

6. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados sugerem que, pelo menos em macrófagos do fenótipo M1, a manipulação do SRA em macrófagos seja um possível alvo terapêutico, principalmente no que diz respeito aos eixos ECA2/Ang-(1-7)/MasR e alamandina/MrgD. São necessários estudos *in vivo* para que seja melhor compreendida a dinâmica envolvendo o SRA e os macrófagos, de forma a se atestar a possibilidade de uso dessas células na clínica. Isso seria interessante em várias doenças, como as cardiovasculares, nas quais a inflamação crônica mediada por macrófagos dos fenótipos M1 e M2 é um mecanismo importante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAM, C.L.; LOWELL, C.A. (2008). The diverse functions of Src family kinases in macrophages. *Front Biosci*, v. 13, p. 4426-4450.

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. (1992). Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: Lewis CE, O'DMcGee J, editors. *The Natural Immune System, Volume II: The Macrophage*. New York, NY: Oxford University Press, p. 75–114.

ANTHONY, R.M. et al. (2006). Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature Med*, v. 12, p. 955–960.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. (2009). “Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells”. *Annu Rev Immunol*, v. 27, p. 669–692.

BADER, M.; GANTEN, D. (2008). Update on tissue renin-angiotensin system. *J Mol Med*, v. 86, n. 6, p. 615-621.

BADER, M. et al. (2014). Mas and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacol Rev*, October, v. 66, p. 1080-1105.

BEN-MORDECHAI, T. et al. (2013). Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *JACC*, v. 62, n. 20, p. 1890–1901.

CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*, v. 24, n. 3, p. 261–271.

CAREY, R.M. (2005). Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *Hypertension*, v. 45, p. 840– 844.

CHANG, N.-C. A. et al. (2001). A Macrophage Protein, YM-1, Transiently Expressed during Inflammation Is a Novel Mammalian Lectin. *J Biol Chem*, v. 276, n. 20, p. 17497–17506.

CHANTEUX, H. et al. (2007). LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinases- and Sp1-dependent mechanisms. *Resp Res*, v. 8, n. 71.

CHAPPELL, M. C. et al. (2014). Update on the Angiotensin Converting Enzyme 2-Angiotensin (1–7)-Mas Receptor Axis: Fetal Programming, Sex Differences, and Intracellular Pathways. *Front Endocrinol*, v. 4, p. 201.

CHEN, J.L. (2017). Angiotensin-(1-7) administration attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in rats with streptozotocin-induced diabetes via Mas receptor activation. *Neuroscience*, v. 346, p. 267-277.

CHUNG, E.Y. et al. (2007) Interleukin-10 expression in macrophage during phagocytosis of apoptotic cell is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity*, v. 27, p. 962-964.

- DAVIS, M.J. et al. (2013) Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBIO*, v. 4, n. 3, e00264-13.
- EDWARDS, J. P. et al. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal Leukoc Biol*, v. 80, n. 6, p. 1298–1307.
- DURIK, M.; PESSOA, B.S.; ROKS, A.J.M. (2012). The renin-angiotensin system, bone marrow and progenitor cells. *Clin Sci*, v. 123, p. 205-223.
- EPELMAN, S; LAVINE, K. J. & RADOLPH, G. J. (2014). Origins and functions of tissue macrophages. *Immunity Rev*, v. 41, n. 1, p. 21-35.
- FERRARIO, C. M. et al. (1997). Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 535–541.
- FERRARIO, C.M. (2006). Role of Angiotensin II in cardiovascular disease - therapeutic implications of more than a century of research. *JRAAS*, v. 7, n. 1.
- FOLKMAN, J.; MOSCONA, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature*, v. 273, n. 5661, p. 345–349.
- GALLOWAY, J.L., ZON, L.I. (2003). Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*, v. 53, p. 139–158.
- GEMBARDT, F. et al. (2008). Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. *Mol Cell Biochem*, v. 319, p.115–123.
- GINHOUX, F. et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, v. 330, p. 841–845.
- GOCHEVA, V. et al. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev*, v. 24, p. 241–255.
- GOMEZ, R. A. (1990). Molecular biology of components of the renin-angiotensin system during development. *Ped Nephrol*, v. 4, n. 4, p. 421–423.
- GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. (2015). The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Prot Immunol*, v. 111, unit 14.1.1-14.1.16.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*, v. 32, n. 5, p. 593–604.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev Immunol*, v. 5, n. 12, p. 953–964.
- GRIENDLING, K. K.; MURPHY, T. J.; ALEXANDER, R. W. (1993). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, v. 87, n. 6, p. 1816–1828.
- HABIYAKARE, B. et al. (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*, v. 95, n. 4, p. 290–295.

- HAMILTON, T.A. et al. (2014) Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization. *Front Immunol*, v. 5, article 554.
- HAMMER, A. et al. (2016) Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *PNAS*, v. 113, n. 49, p. 14109-14114.
- HANSSON, G. K.; LIBBY, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Rev Immunol*, v. 6, n. 7, p. 508–519.
- HASHIMOTO, D. et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, v. 38, p. 792-804.
- HENNINGS, H. et al. (1993) FVB/N mice: An inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 2353-2358.
- HESSE, M. et al. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*, v. 167, p. 6533–6544.
- HUME, D.A. (2015). The many alternative faces of macrophage activation. *Front Immunol*, v. 6, article 370.
- ITOU, T. et al. (2006). Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. *Clin Vaccines Immunol*, v. 13, n. 5, p. 575-583.
- JABLONSKI, K.A. et al. (2015). Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One*, v. 10, n. 12, e0145342.
- KATO, T. et al. (2014). Bone marrow angiotensin AT2 receptor deficiency aggravates atherosclerosis development by eliminating macrophage liver X receptor-mediated anti-atherogenic actions. *JRAAS*, v. 16, n. 4, p. 936-946.
- KHALLOU-LASCHET, J. et al. (2010). Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One*, v. 5, n. 1., e8852.
- KOPYDLOWSKI, K.M. et al. (1999). Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol*, v. 163, p. 1537-1544.
- KUMAR, R.; SINGH, V. P.; BAKER, K. M. (2009). The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Curr Hypertens Rep*, v. 11, n. 2, p. 104–110.
- LACEY, D.C. et al. (2012). Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol*, v. 188, n. 11, p. 5752–65.
- LAUTNER, R. Q.; VILLELA, D. C.; FRAGA-SILVA, R. A. et al. (2013). Discovery and Characterization of Alamandine A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circ Res*, v. 112, n. 8, p. 1104–1111.
- LAWRENCE, T.; NATOLI, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Rev Immunol*, v. 11, p. 750-761.

- LEE, H.S. et al. (2007). Src tyrosine kinases mediate activations of NF-kappaB and integrin signal during lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol*, v. 179, n. 10, p. 7001-7011.
- LIN, C. et al. (2011). Angiotensin-converting enzyme is required for normal myelopoiesis. *J FASEB*, v. 25, p. 1145–1155.
- LIU, Y.W. et al. (2006). Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-kappaB-induced CCAAT/enhancer-binding protein delta in mouse macrophages. *Cell Signal*, v. 18. N. 9, p. 1492-1500.
- LOVREN, F. et al. (2008). Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 295, n. 4, p. H1377–H1384.
- LU, H. et al. (2008). Renin inhibition reduces hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*, v. 118, n. 3, p. 984-993.
- MA, Y. et al. (2013). Matrix metalloproteinase-28 deletion exacerbates cardiac dysfunction and rupture after myocardial infarction in mice by inhibiting M2 macrophage activation. *Circ Res*, v. 112, n. 4, p. 675–688.
- MACKANESS, G.B. (1962). Cellular resistance to infection. *J Exp Med*, v. 116, p. 381-406.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rec Immunol*, v. 15, p. 323-350.
- MAKITA, N. et al. (2014). IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int Immunol*, v. 27, n. 3, p. 131-141.
- MANTOVANI, A. et al. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, v. 25, n. 12, p. 677-686.
- MARQUES, S.M. et al. (2011). Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc Res*, v.82, p. 246-252.
- MCWHORTER, F. .Y et al. (2013). Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *PNAS*, v. 110, n. 43, p.17253-17258.
- MEDBURY, H.J.; WILLIAMS, H.; FLETCHER, J.P. (2014). Clinical significance of macrophage phenotypes in cardiovascular disease. *Clin Transl Med*, v. 3, n. 42.
- MERAD, M. et al. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunol*, v. 3, p. 1135–1141.
- MILLS, C.D. et al. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, v. 164, p. 6166–6173.
- MING, X.-F. et al. (2012). Arginase II Promotes Macrophage Inflammatory Responses Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Contributing to Insulin Resistance and Atherogenesis. *J Am Heart Assoc*, v. 1, n. 4, p. e000992–e000992.
- MOSSER, D. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, v 73, p. 209-212.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev Immunol*, v. 8, n. 12, p. 958–969.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. (2008). Activation of Murine Macrophages. In: COLIGAN, J. E. et al. (Org.). *Curr Prot Immunol*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., chapter 14, unit 14.2.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. (2011). Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets. *Nature Rev Immunol*, v. 11, n. 11, p. 723–37.

MURRAY, P.J. et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 14-20.

MÜLLER, A. M. et al. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, v. 1, p. 291–301.

NARUSE, K. et al. (1982) Immunohistochemical evidence that angiotensins I and II are formed by intracellular mechanism in juxtaglomerular cells. *Hypertension*, v. 4, n. 3 Pt 2, p. 70–74.

NGUYEN DINH CAT, A.; TOUYZ, R. M. (2011). A new look at the renin–angiotensin system—Focusing on the vascular system. *Peptides*, v. 32, n. 10, p. 2141–2150.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, v. 20, n. 2, p. 87-103.

OKAMURA, A. et al. (1999) Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens*, v. 17, p. 537-545.

PARKS, B. W.; LUSIS, A. J. (2013). Macrophage Accumulation in Atherosclerosis. *New England J Med*, v. 369, n. 24, p. 2352–2353.

PAUL, M.; MEHR, A.P; KREUTZ, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin system. *Physiol Rev*, v. 86, p. 747-803.

PAWELEK, K.A. et al. (2016). Within-Host Models of High and Low Pathogenic Influenza Virus Infections: The Role of Macrophages. *Plos One*, v. 11, n. 2, e0150568.

PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. (2009). Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *The EMBO J*, v. 28, n. 14, p. 2114–2127.

PERNOW, J.; JUNG, C. (2013). Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res*, v. 98, n. 3, p. 334–343.

PORCHERAY, F. et al. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*, v. 142, n. 3, p. 481-489.

POURCET, B.; PINEDA-TORRA, I. (2013). Transcriptional regulation of macrophage arginase 1 expression and its role in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, v. 23, n. 5, p. 143–152.

RAES, G. et al. (2002). FIZZ-1 e YM as tools to discriminate between differentially activated macrophages. *Dev Immunol*, v. 9, n. 3, p. 151-9.

- RAFATIAN, N. et al. (2013) Role of renin-angiotensin system in activation of macrophages by modified lipoproteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 305, p. H1309-H1320
- RAM, P.T.; IYENGAR, R. (2001). G protein coupled receptor signaling through the Src and Stat3 pathway: role in proliferation and transformation. *Oncogene*, v. 20, p. 1601–1606.
- RATH, M. et al. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol*, v. 5, article 532.
- REN, Y.; GARVIN, J. L.; CARRETERO, O. A. (2002). Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*, v. 39, n. 3, p. 799–802.
- ROCHA, V.Z.; FOLCO, E.J. (2011). Inflammatory concepts of obesity. *Int J Inflamm*, v. 2011, p. 529061.
- RÓSZER, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*, v. 2015:816460.
- RUFFELL, D. et al. (2009). A CREB–C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, p. 17475–17480.
- SAMPAIO, W. O. et al. (2007). Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*, v. 50, n. 6, p. 1093–1098.
- SANTOS, R. A. et al. (2003). Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci*, v. 100, n. 14, p. 8258–8263.
- SANTOS, R.A., FERREIRA, A.J., SIMÕES E SILVA, A.C. (2008). Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*, v. 93, n. 5, p. 519–527.
- SCHADT, E.E. et al., (2003). Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature*, v. 422, p. 297–302.
- SCHEBESCH, C. et al. (1997). Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology*, v. 92, p. 478–486.
- SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I. & FRISE, E. et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, v. 9, n. 7, p. 676-682.
- SCHULMAN, I.H.; RAIJ, L. (2008). The angiotensin type II receptor: what is its clinical significance? *Current Science Inc*, v. 10, n. 3, p. 188–193.
- SKIBA, D.S. et al. (2017) Antiatherosclerotic effect of Ang-(1-7) non-peptide mimetic (AVE 0991) is mediated by inhibition and plaque inflammation in early atherosclerosis. *Br J Pharmacol*.
- SOUZA, L. L.; COSTA-NETO, C. M. (2012). Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *J Cell Physiol*, v. 227, n. 5, p. 2117–2122.
- SOUZA, L.L. et al. (2014). Receptor Mas protects mice against hypothermia and mortality induced by endotoxemia. *Shock*, v. 41, n. 4, p. 331-336.

STEIN, M. et al. (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, v. 176, p. 287-292.

STOUT R.D. et al. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*, v. 175, p. 342–349.

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. (2005). Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 289, n. 4, p. H1560–1566.

TAKEDA, K. et al. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*, v. 380, p. 627–630.

TAKETO M. ET AL. (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 88, n. 6, p. 2065-2069.

TAPIERO, H. et al. (2002). L-Arginine. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, v. 56, n. 9, p. 439–445.

TETZNER, A.; GEBOLYS, K. et al. (2016) G-protein-coupled receptor MrgD is a receptor for angiotensin-(1-7) involving adenylyl cyclase, cAMP, and phosphokinase A. *Hypertension*, v. 68, p. 185-194.

TEUPSER, D. et al. (2006). Atherosclerosis quantitative trait loci are sex- and lineage-dependent in an intercross of C57BL/6 and FVB/N low-density lipoprotein receptor^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 103, n. 1, p. 123-128.

THATCHER, S.E. et al. (2011). Angiotensin-converting-enzyme 2 deficiency in whole body or bone marrow-derived-cell increases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 31, n. 4, p.758-765.

THOMAS, G.R.; MCCROSSAN, M.; SELKIRK, M.E. (1997). Cytostatic and cytotoxic effects of activated macrophages and nitric oxide donors on *Brugia malayi*. *Infect Immun*, v. 65, p. 2732-2739.

THOMAS, M.C. Et al. (2010). Genetic Ace2 Deficiency Accentuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis in the ApoE Knockout Mouse. *Circ Res*, v. 107, n. 7, p. 888-897.

THORREZ, L. et al. (2011). Tissue-specific disallowance of housekeeping genes: the other face of cell differentiation. *Genome Res*, v. 21, p.95–105.

TSUBAKIMOTO, Y. et al. (2009). Bone marrow angiotensin AT1 receptor regulates differentiation of monocyte lineage progenitors from hematopoietic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 29, p. 1529–1536.

TUGAL, D.; LIAO, X.; JAIN, M.K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Thromb Vasc Biol*, v. 33, p. 1135-1144.

VAN DER MEIJ, E. et al. (2013). A Clinical Evaluation of Statin Pleiotropy: Statins Selectively and Dose-Dependently Reduce Vascular Inflammation. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, e53882.

- VAN FURTH, R. et al. (1972). Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line. *Bull World Health Organ*; v. 47, n. 5, p. 651-658.
- VILLALOBOS, L.A.; HIPÓLITO-LUENGO, A.; RAMOS-GONZÁLEZ, M. et al. (2016) The Angiotensin-(1-7)/Mas Axis Counteracts Angiotensin II-Dependent and -Independent Pro-inflammatory Signaling in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Front Pharmacol.* v. 7, p. 482.
- VILLELA, D. C.; PASSOS-SILVA, D. G.; SANTOS, R. A. S. (2014). Alamandine: a new member of the angiotensin family. *CurR Op Nephrol Hypertens*, PMID: 24389733, v. 23, n. 2, p. 130–134.
- VOLKMAN, A.; GOWANS, J. L. (1965). The origin of macrophages from human bone marrow in the rat. *Br J Exp Pathol*, v. 46, p. 62–70.
- WOOLLARD, K. J.; GEISSMANN, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews. Cardiology*, v. 7, n. 2, p. 77–86.
- XIONG, Y. et al. (2014). Long term exposure to L-arginine accelerates endothelial cell senescence through arginase-II and S6K1 signaling. *Aging*, v. 6, n. 5, p. 369–379.
- XU, P. et al. (2008). Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension*, v. 51, n. 2, p. 574–580.
- WANG, C. et al. (2013). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology*, v. 14, n. 6.
- YAMAMOTO, K. et al. (1992). In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 19, n. 6 Pt 2, p. 692–696.
- YANG, J. M. et al. (2013). Angiotensin-(1-7) Dose-Dependently Inhibits Atherosclerotic Lesion Formation and Enhances Plaque Stability by Targeting Vascular Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 33, n. 8, p. 1978–1985.
- ZHU, W.; GILMOUR, M.I. (2009). Comparison of allergic lung disease in three mouse strains after systemic or mucosal sensitization with ovalbumin antigen. *Immunogenetics*, v. 61, n. 3, p. 199-207.
- ZYLKA, M.J.; RICE, F.L.; ANDERSON, D.J. (2005). Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron*, v. 45, p.17–25.

ANEXO I

RELAÇÃO DE INICIADORES UTILIZADOS NA qPCR

NOME	SEQUÊNCIA	CONCENTRAÇÃO	REFERÊNCIA
Arg1^a	5'-CTCCAAGCC AAAGTCCTT AGAG-3' (senso)	100nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-3' (antissenso)		
Arg2^a	5'- TCCTCCACGGGCAAATTCC -3' (senso)	100nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'- GCTGGACCATATTCCACTCCTA -3' (antissenso)		
CCL2^a	5'-TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA-3' (senso)	100nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'-GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT-3' (antissenso)		
CD206^b	5'- CATGAGGCTTCTCCTGCTTCTG -3' (senso)	200nM	JUNG et al., (2012) ³
	5'- TTGCCGTCTGAACTGAGATGG -3' (antissenso)		
FIZZ-1^b	5'- CCCTCCACTGTAACGAAGACTC -3' (senso)	100nM	KARO-ATAR et al., (2013) ⁴
	5'- CACACCCAGTAGCAGTCATCC -3' (antissenso)		
GAPDH^a	5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG -3' (senso)	100nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA -3' (antissenso)		
IL-1β^a	5'- GCAACTGTTCTGAACTCAACT -3' (senso)	100nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'- ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT -3' (antissenso)		
IL-10^a	5'- GCTCTTACTGACTGGCATGAG -3' (senso)	100nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'- CGCAGCTCTAGGAGCATGTG -3' (antissenso)		

iNOS^a	5'- GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA -3' (senso)	100nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'- GTGGACGGGTTCGATGTCA -3' (antissenso)		
MasR^c	5'- AGGGTGA CTGACTGAGTTTGG -3' (senso)	400nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'- GAAGGTAAGAGGACAGGAGC -3' (antissenso)		
MrgD^c	5'- TTTTCAGTGACATTCCTCGCC -3' (senso)	900nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ²
	5'- GCACATAGACACAGAAGGGAGA -3' (antissenso)		
TNF^a	5'- CCCTCACACTCAGATCATCTTCT -3' (senso)	100nM	Laboratório de Hipertensão (ICB/UFMG) ¹
	5'- GCTACGACGTGGGCTACAG -3' (antissenso)		
YM-1^b	5'- GGGCATACTTTATCCTGAG -3' (senso)	100nM	RAES et al., (2002) ⁵
	5'- CCACTGAAGTCATCCATGTC -3' (antissenso)		

^a Fabricante: *Integrated DNA Technologies* (IDT)

^b Fabricante: Exxtend

^c Fabricante: Biotex

¹ Iniciador desenhado por Danielle Gomes Passos Silva (PhD) (comunicação pessoal).

² Iniciador desenhado por Diasy Motta Santos (PhD) (comunicação pessoal).

³ JUNG, U.J. et al. (2012). Fatty Acids Regulate Endothelial Lipase and Inflammatory Markers in Macrophages and in Mouse Aorta: A Role for PPAR γ . *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 32, n. 12, p. 2929–2937.

⁴ KARO-ATAR, D. et al. (2013). Paired immunoglobulin-like receptor-B inhibits pulmonary fibrosis by supressing profibrogenic properties of alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 48, n. 4, p. 456-464.

⁵ RAES, G. et al. (2002). FIZZ-1 e YM as tools to discriminate between differentially activated macrophages. *Dev immunol*, v. 9, n. 3, p. 151-159.