



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

Flávia Rago Glória Gonçalves

**USO DE MOLÉCULAS PRO-RESOLUTIVAS COMO MEDIDA
TERAPÊUTICA PARA TRATAR INFECÇÃO POR INFLUENZA A E
FIBROSE PULMONAR**

Belo Horizonte,

2021

Flávia Rago Glória Gonçalves

**USO DE MOLÉCULAS PRO-RESOLUTIVAS COMO MEDIDA
TERAPÊUTICA PARA TRATAR INFECÇÃO POR INFLEUNZA A E
FIBROSE PULMONAR**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira
(Departamento de Bioquímica e Imunologia –

Belo Horizonte

2021

043

Gonçalves, Flávia Rago Glória.

Uso de moléculas pro-resolutivas como medida terapêutica para tratar infecção por Influenza a e fibrose pulmonar [manuscrito] / Flávia Rago Glória Gonçalves. – 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Fibrose Pulmonar. 3. Influenza Aviária. 4. Inflamação. 5. Angiotensinas. 6. Lipoxinas. I. Teixeira, Mauro Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE FLÁVIA RAGO GLÓRIA GONÇALVES. Aos vinte e sete dias do mês de agosto de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” na plataforma “Google Meet”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Uso de moléculas pro-resolutivas como medida terapêutica para tratar infecção por Influenza A e fibrose pulmonar", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Mauro Martins Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Virgínia Lemos (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. André Talvani (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dra. Cristiana Couto Garcia (Fiocruz/RJ), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Mauro Martins Teixeira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de agosto de 2021.

Dra. Virgínia Lemos (UFMG) *Virgínia Soares Lemos*

Dr. André Talvani (Universidade Federal de Ouro Preto)

Dra. Cristiana Couto Garcia (Fiocruz/RJ) *Cristiana Couto Garcia*

Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)

Dr. Mauro Martins Teixeira - Orientador (UFMG)

Aos meus pais, Cláudia e Giorgio,
por serem meus melhores amigos e incentivadores.

A vocês, meu muito obrigada!
A Deus por sua maravilhosa graça.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a minha família que são um alicerce pra mim. Foram tantas conversas e desabafos que eles pacientemente ouviram e sabiamente aconselharam. Eles que me conhecem mais do que eu mesma e que me amam com um amor incondicional, o qual eu sinto em todos os detalhes das atitudes deles. A minha mãe Claudia, ao meu pai Giorgio, ao meu irmão Bruno, e ao meu filho Henrique. Agradeço também em especial a minha melhor amiga e cunhada, Izabella, com quem eu amo estar junto e compartilhar a vida. Eu amo vocês!

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Mauro Martins Teixeira, pela oportunidade única de fazer parte do seu grupo de pesquisa e de carregar em meus trabalhos o seu nome, o qual é referencia nacional e internacional em pesquisa e saúde.

Agradeço ao grupo Imunofarmacologia, ao qual tive o privilégio de fazer parte desde 2013, por tornarem o ambiente de trabalho mais prazeroso e divertido. Muitas pessoas vi chegar e ir embora, e com cada uma delas, mesmo que elas não saibam, tive a oportunidade de aprender e por causa delas, trazer comigo experiências que me fizeram uma pesquisadora melhor. Gostaria de agradecer principalmente a minha maior companheira, Eliza Mathias. Ela, que foi uma das pessoas mais gentis que tive o privilégio de ter por perto durante todo o período do meu doutorado. Foram muitas conversas, varias risadas, e, principalmente, a cumplicidade na hora de levar o fardo que nosso trabalho nos impõe. Uma excelente pesquisadora com quem aprendi muito. Sou extremamente grata pela vida dela porque sei que, sem ela, a caminhada teria sido muito mais difícil. Lica, como já te disse antes, você é luz! Nunca perca esse brilho, mesmo que você não receba de volta tudo o que merece. Agradeço também, em especial, ao Franciel, pessoa com quem tive a oportunidade de me aproximar nos últimos meses do meu doutorado e com quem gostaria de ter tido mais tempo para aprofundar nossa amizade. Ele, que é excepcionalmente competente e inteligente, e que com seu jeito calmo me ensinou muito. Franciel, você merece todo o reconhecimento pela sua competência e conhecimento. Obrigada demais pela sua amizade e pela sua disposição em me ajudar e ensinar! Foram muitos dias que ficamos até tarde da noite e muitos finais de semana indo ao laboratório e vocês fizeram toda diferença.

Agradeço à Ilma por estar sempre disposta a solucionar qualquer problema e pelos momentos de conversa que foram muito prazerosos e divertidos. Ilma, o que seríamos de nós sem você?! Obrigada! Agradeço também a Rosi e ao Hermes que trabalham de maneira excelente para facilitar nosso dia-a-dia.

Agradeço ao Professor Geovanni, quem me ajudou com toda parte histopatológica, por ser tão gentil e disposto. Foram muitas lâminas analisadas e muito aprendizado passado por ele de uma forma tão natural e leve.

Aos meus colaboradores Professor Alexandre e Ana Paula por me cederam o vírus e me ajudarem na parte da titulação viral; ao Professor Robson por ter cedido a angiotensina; a Professora Catherine Godson por ter cedido a lipoxina; e ao Professor Remo e ao Lucas Kraemer por ter me ajudado na parte de fibrose e função pulmonar.

Agradeço também ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia e por todo corpo docente pela oportunidade de realizar minha tese em um programa de excelência e com professores que muito acrescentaram na minha formação como profissional.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

RESUMO

Influenza A é um vírus da família *Orthomixoviridae* que causa uma doença inflamatória aguda com altos índices de morbidade e mortalidade. Atualmente, a intervenção mais eficiente é a vacinação e algumas terapias anti-inflamatórias, tornando-se relevante estudar outras alternativas terapêuticas no tratamento dessa infecção. Uma outra doença que acomete os pulmões é a fibrose pulmonar. Ela é uma doença inflamatória crônica gerada pela constante ativação do processo inflamatório com consequente deposição de colágeno nos pulmões e perda de função desse órgão podendo levar a morte. Devido ao fato de o procedimento que melhor combate esse quadro clínico ainda ser o transplante de pulmão, torna-se relevante o estudo e desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento dessa condição clínica. Recentemente, o uso de moléculas pró-resolutivas têm se tornado promissor como tratamento de doenças inflamatórias. Moléculas pró-resolutivas são moléculas produzidas na fase resolutiva da inflamação com propriedades anti-inflamatórias e anti-fibróticas, capazes de coordenar o *clearance* celular com consequente retorno do tecido a homeostase. Lipoxina A₄ e angiotensina 1-7 são moléculas pró-resolutivas conhecidas por diminuírem recrutamento de células inflamatórias, por induzirem a diminuição da produção de quimiocinas, de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas. Em nosso trabalho, estudamos o uso dessas moléculas como opção terapêutica para tratar fibrose pulmonar e infecção por Influenza A. Observamos que o tratamento preventivo com a angiotensina 1-7 na fibrose pulmonar, começando uma hora antes da indução da fibrose, gerou a diminuição do recrutamento celular nos dias 3, 7, e 21 após a indução e aumento do número de células apoptóticas. Houve também uma diminuição da deposição de colágeno no tecido nos dias 14 e 21 assim como melhorou, no dia 21, a função pulmonar de animais tratados com essa molécula. A melhora desses parâmetros foi relacionada ao aumento da sobrevivência desses animais. Porém, quando testamos o efeito terapêutico dessa molécula observamos que ele é tempo-dependente. Quando iniciamos o tratamento 3 dias após a indução da fibrose, não conseguimos mais observar uma melhora na sobrevivência dos animais, apesar do tratamento gerar redução do número de células e de deposição de colágeno nos pulmões dos animais tratados. Já quando iniciamos o tratamento no dia 7 após a indução da fibrose, o efeito benéfico da angiotensina 1-7 foi perdido completamente. Resolvemos então testar o análogo de outro pró-resolutivo, benzo-lipoxina A₄, na fibrose pulmonar. Apesar de outro análogo pró-resolutivo, a benzp-lipoxina A₄, também não ter melhorado os parâmetros na fibrose pulmonar, o mesmo foi testado em um contexto de infecção por Influenza A. Observamos que animais infectados com Influenza A/WSN/33 H1N1 e que receberam o tratamento, iniciado no 3º dia após infecção, apresentaram aumento da sobrevivência e diminuição

do recrutamento celular, de níveis de IFN- γ e do dano pulmonar. O tratamento também diminuiu a expressão do marcador de macrófago M1- iNOS- e aumentou o número de células apoptóticas e eferocitose. Este estudo reforçou a importância das diferentes ações dos marcadores pró-resolutivos dependentes do tempo de administração e da doença inflamatória associada.

Palavras-chave: Resolução; Fibrose Pulmonar; Influenza A; Inflamação; Angiotensina 1-7; Lipoxina A₄; Mediadores pró-resolutivos.

ABSTRACT

Influenza A is a virus from the *Orthomixoviridae* family responsible to cause an acute inflammatory disease with high numbers of mortality and morbidity. Nowadays, the most efficient intervention is vaccination and some anti-inflammatory therapies, which become relevant studies that seek new therapeutic strategies to treat that infection. Lung fibrosis is another lung disease with constant activation of the inflammatory process leading to high levels of collagen deposition which can cause functional loss of this organ. It is a chronic disease that can lead to death. Studies that attempt to find effective therapies to treat this disease are relevant once the best strategy against this clinical condition is organ transplant. Recently, the use of pro-resolving mediators has become promising as a treatment for inflammatory diseases. Pro-resolving mediators are molecules produced in the resolution phase of inflammation with anti-inflammatory and anti-fibrotic proprieties responsible for cell clearance and returning to homeostasis. Lipoxin A₄ and angiotensin 1-7 are pro-resolving mediators known to decrease not only cell recruitment but also chemokines, pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines. Here, we studied the use of those pro-resolving mediators as therapeutic strategies to treat lung fibrosis and Influenza A infection. We showed that the preventive treatment with angiotensin 1-7, starting one hour before the induction of fibrosis, decreased cell recruitment on days 3, 7 and 21 after the induction and increased the numbers of apoptotic cells. There was a decrease in collagen deposition on days 14 and 21, and an improvement of lung function on day 21. The treatment increased survival as well. Nevertheless, when we tested the therapeutic effect of this molecule in this model, we noticed that its beneficial effect was time dependent. When the treatment started on day 3, after induction of fibrosis, there was no difference in lethality although the treatment decreased cell recruitment and collagen deposition in the lungs of treated animals. But when the treatment started on day 7 after the induction, the beneficial effect of this molecule was completely lost. Then, we decided to test an analog of another pro-resolving mediator, benzo-lipoxin A₄, as a treatment for lung fibrosis, however, there was no difference in the analyzed parameters. Once the same pro-resolving mediator shows different effects in different models of diseases, we decided to test the use of benzo-lipoxin A₄ as a treatment for Influenza A infection. Animals infected with Influenza A/WSN/33 H1N1 and treated with benzo-lipoxin A₄, starting on day 3 post infection, presented an increase in survival and decrease in cell recruitment, levels of IFN- γ and lung damage. The treatment also decreased the expression of M1 marker – iNOS- and increased apoptotic cells and eferocitosis. These results

show a promising therapeutic effect of lipoxin A₄ as a treatment for Influenza A infection, contributing to an anti-inflammatory and pro-resolving scenario. Our work also shows the importance of understanding the role of each pro-resolving mediator and to test them as a therapeutic strategy both in acute inflammatory diseases and in chronic inflammatory diseases since they could present different effects in each one of those diseases.

Keywords: Lung fibrosis; Influenza A; Inflammation; Resolution; Angiotensin 1-7; Lipoxin A₄; Pro-resolving mediators.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem ilustrativa do corte transversal de um alvéolo.	17
Figura 2. Influenza A.	19
Figura 3. Transporte dos RNPs da síntese até o empacotamento.....	19
Figura 4. Interação de IAV com as células pulmonares.	21
Figura 5. Esquema demonstrativo do reconhecimento de PAMPs por PRRs.....	32
Figura 6. Esquema fisiopatológico da BILI.....	28
Figura 7. Curso da resposta inflamatória.	34
Figura 8. Resolução da inflamação	35
Figura 9. Troca de classe de mediadores lipídicos.....	37
Figura 10. Esquema simplificado do sistema renina angiotensina (RAS).....	39
Figura 11. Vias do metabolismo do ácido araquidônico.	59
Figura 12. Papel do receptor FPR2 na infecção por Influenza A em camundongos.	86
Figura 13. Papel do receptor FPR2 nos níveis de citocinas no BAL de animais infectados com Influenza A.	87
Figura 14. Histologia pulmonar de animais WT e FPR2 ^{-/-} infectados com influenza.	88
Figura 15. Efeito do tratamento com benzo-LXA ₄ na letalidade, na perda de peso e na carga viral de animais infectados com IAV..	90
Figura 16. Efeito do tratamento com benzo-LXA ₄ no recrutamento celular e nos processos de apoptose e eferocitose.	91
Figura 17. Efeito do tratamento com benzo-LXA ₄ nos níveis de citocinas no BAL.	92
Figura 18. Análise morfológica do processo de apoptose e eferocitose em animais infectados com influenza e tratados ou não com benzo-LXA ₄	93

Figura 19. Estratégia de gate de citometria de fluxo para eferocitose em animais infectados com influenza e tratados ou não com benzo-LXA ₄	94
Figura 20. Histologia pulmonar de animais infectados com influenza tratados ou não com benzo-LXA ₄	95
Figura 21. Avaliação do efeito do tratamento com o análogo de lipoxina A4 na fibrose pulmonar induzida por sílica	105

LISTA DE ABREVEAÇÕES

IAV- Vírus Influenza A

BALT - Tecido Linfoide Associado aos Brônquios

MAIT - Invariantes Associadas a Mucosa

RNP – Ribonucleoproteico

HA - Hemaglutinina

NA – Neuraminidase

MTOC - do inglês, *microtubule organising centre*

IFN- Interferon

RRPs - do inglês *pattern recognition receptors*, PRRs

TLR - Receptores do tipo toll

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano

ISGs – Genes Estimulados por Interferons

BLM – Bleomicina

BLT – *Bleomycin lung toxicity*

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

Fe(II) – Ferro ferroso

Fe(III) – Ferro férrico

BLH – Hidrolase de Bleomicina

EMT – Transição mesenquimal-epitelial

EndEMT – Transição mesenquimal-endotelial

GM-CSF - Colônia de Granulócitos e Monócitos

TGF- β - Fator de crescimento transformador β

TNF- α - Fator de Necrose tumoral α

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL17a – Interleucina 17^a

IL-18 – Interleucina 18

IL-21 – Interleucina 21

IL-22 – Interleucina 22
IL-33 – Interleucina 33
LPS – Lipopolissacarídeo
TLR – Receptor de célula T
Tregs – Linfócitos T regulatórios
CD8⁺ T_{RM} – Células de memória tecidual TCD8⁺
NKT – Células Natural Killer
ILCs - Células Linfoides Inatas
PMNs – Neutrófilos Polimorfonucleares
NETs – Armadilha extracelular de neutrófilos
BILI – Dano Pulmonar Induzido por Bleomicina
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaqueta
COL1 – Colágeno tipo 1
COL1A1 – Gene de colágeno tipo 1, alfa 1
COL1A2 – Gene de colágeno tipo 1, alfa 2
CTGF – Proteína da matriz extra celular
SARA – Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
D_{LCO} - Difusão pulmonar
FEV1 – Volume Expiratório Forçado em 1 segundo
pO₂ - Pressão de oxigênio
pCO₂ - Pressão de gás carbônico
SPM - Moléculas pró-resolutivas especializadas
AMPc – AMP cíclico
GILZ - *Glucocorticoide-Induced Leucine Zipper*
AnxA1 – Anexina A1
LXA₄ – Lipoxina A₄
Benzo-LXA₄ – Benzo-lipoxina A₄
RAS – Sistema Renina-angiotensina
Ang II – Angiotensina II
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
AT1R – Receptor de angiotensina II do tipo 1
ECA 2 – Enzima Conversora de Angiotensina do tipo 2
Ang-(1-7) – Angiotensina 1-7
ARDS - Síndrome Distress Respiratório Agudo

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

NFκB – Fator nuclear kappa B

UI – Unidade Internacional

NaCl 0,9% - Salina 0,9%

BAL – Lavado Broncoalveolar

NAG – N-acetilglicosaminidase

MPO – Mieloperoxidase

CICLO – Ciclodextrina

RPM – Rotação Por Minuto

FPR2^{-/-} - Animais *knockout* para FPR2

PFU – Unidade formadora de placa

TMB - 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina

DMSO – dimetilsulfóxido

MDCK – Madin-Darby Canine Kidney Epithelial cells

At-RvD1 - *aspirin-triggered resolvin D1*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Pulmão	18
1.2	Doenças Pulmonares	20
1.2.1	<i>Influenza</i>	20
1.2.2	<i>Fibrose Pulmonar</i>	28
1.3	Resolução e moléculas pró-resolutivas	35
1.3.1	<i>Angiotensina 1-7</i>	41
1.3.2	<i>Lipoxina A4</i>	62
2	JUSTIFICATIVA	65
3	OBJETIVO	67
3.1	Objetivo geral.....	67
3.2	Objetivos específicos	67
4	MÉTODOS E RESULTADOS	68
4.1	Capítulo 1 - Fibrose pulmonar e Angiotensina 1-7	68
4.2	Capítulo 2 – Influenza A e lipoxina A ₄	81
4.2.1	<i>Materiais e métodos:</i>	81
4.2.2	<i>RESULTADOS</i>	88
4.2.3	<i>DISCUSSÃO</i>	99
4.2.4	<i>CONCLUSÃO</i>	102
5	DISCUSSÃO GERAL	103
6	CONCLUSÃO GERAL	105
7	MATERIAL SUPLEMENTAR	106
	REFERÊNCIAS.....	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pulmão

O pulmão é um órgão que tem como função principal a troca gasosa. Estruturalmente ele pode ser dividido em duas partes: (I) vias aéreas centrais, sendo composta pela traqueia, brônquios e bronquíolos terminais (vias condutoras dos gases respiratórios) e (II) parênquima periférico, que abrange os bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos (regiões de troca gasosa). 300 milhões de alvéolos podem ser encontrados em um indivíduo adulto, tendo cada um deles 0,25mm de diâmetro. Em humanos adultos, estima-se que a área da superfície alveolar pode chegar a 100 m² enquanto a área da superfície endotelial dos capilares um pouco menor (~10-20%) (Weibel *et al.*, 1984).

A superfície alveolar é recoberta por dois tipos celulares (figura 1). Os pneumócitos do tipo I são células epiteliais escamosas com a função de formar extensões citoplasmáticas, as quais penetram os poros de Kohn (orifícios na parede alveolar que conectam um alvéolo ao outro). Os pneumócitos do tipo II são células epiteliais em forma de cubo que sintetizam e secretam o surfactante pulmonar que cobre a superfície alveolar (KUHN, 1978). Pneumócitos do tipo II possuem a capacidade de dar origem a novas células do tipo II, além de se diferenciar em pneumócitos do tipo I para substituir aqueles que sofreram danos (ADAMSON; BOWDEN, 1974). O volume ocupado pelos pneumócitos do tipo I é de aproximadamente duas vezes maior que o ocupado pelos pneumócitos do tipo II, enquanto que a área alveolar abrangida pelas células do tipo I é cerca de 50 vezes maior do que a área abrangida pelas células do tipo II. Entretanto, ao avaliarmos, em porcentagem, o número de células dentro da parede alveolar, 8% são pneumócitos do tipo I, 16% são pneumócitos do tipo II, 30% são células endoteliais dos capilares, 36% são células intersticiais e 10% constituem os macrófagos alveolares (ADAMSON; BOWDEN, 1979).

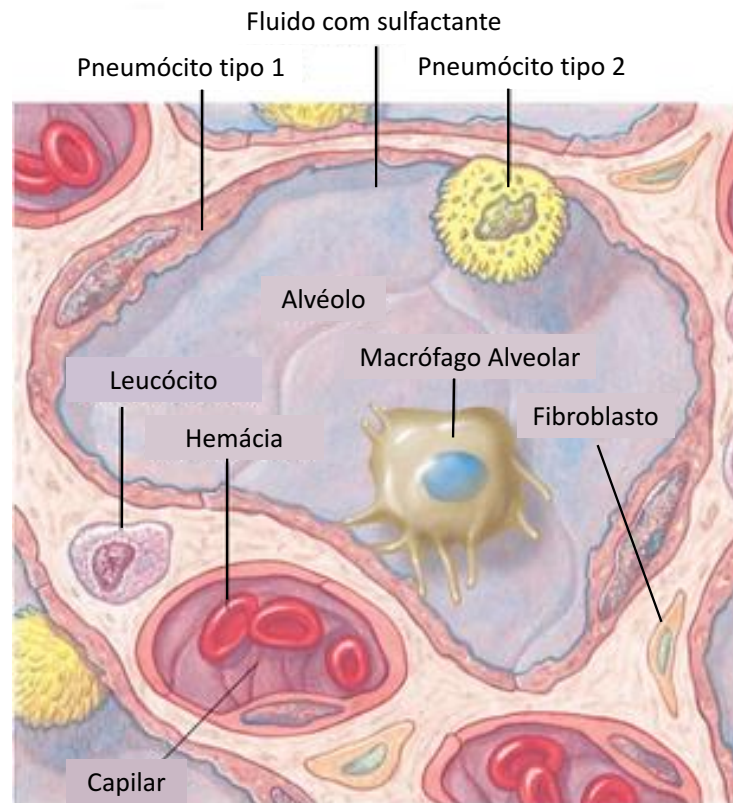


Figura 1. Imagem ilustrativa do corte transversal de um alvéolo. Espaço alveolar é composto por pneumócitos tipo 1 e 2; o espaço onde se encontram os fibroblastos é denominado interstício, sendo esse também o caminho de passagem e de acúmulo das células recrutadas dos capilares alveolares.

A área alveolar de um adulto pode chegar a 100m^2 já que é nessa área que a troca gasosa ocorre. Assim, o pulmão é um órgão que pode ser exposto constantemente a uma variedade de antígenos do ambiente. Devido a isso, o trato respiratório possui uma efetiva proteção mecânica, tais como pelos nasais, cílios do epitélio respiratório, muco e surfactante, juntamente com um elaborado sistema imune. Uma ampla quantidade de linfócitos pode ser encontrada distribuída pelo tecido pulmonar (HOLT; SCHON-HEGRAD, 1987) e em compartimentos especializados como o tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) e linfonodos que drenam o órgão (Breel *et al.*, 1988). Além disso, células dendríticas, macrófagos intersticiais e alveolares são encontrados no trato respiratório e podem ser ativados, desencadeando processos inflamatórios crônicos com consequente desenvolvimento de fibrose (HOLT; SCHON-HEGRAD, 1987; SERTL *et al.*, 1986).

1.2 Doenças Pulmonares

1.2.1 Influenza

Influenza é um vírus envelopado, composto por RNA de fita simples senso negativo, pertencente à família *Orthomyxoviridae* (HUTCHINSON; FODOR, 2013). É um patógeno que gera um grande número de mortes em todo mundo sendo o responsável por causar milhões de mortes, consequência das pandemias de 1918 (gripe espanhola), de 1957 (gripe asiática), de 1968 (gripe de Hong Kong) e de 2009 (gripe suína) (AKIN; GÖZEL, 2020; TAVARES; TEIXEIRA; GARCIA, 2017). Ele infecta o trato respiratório superior podendo também infectar os brônquios, bronquíolos e alvéolos pulmonares no trato respiratório inferior sendo o dano celular induzido por esse vírus a principal causa dos sintomas clínicos e da virulência desse agente infeccioso (IBRICEVIC *et al.*, 2006; ROSEN *et al.*, 2010).

Seu genoma é dividido em segmentos (oito no caso da Influenza A) e cada segmento é envolvido por proteínas virais formando um complexo ribonucleoproteico (RNP) (figura 2). Os RNPs virais entram no núcleo da célula hospedeira para que haja a replicação do seu material genético. Como resultado desse processo, o recém-sintetizado RNP passa por uma série de sistemas de transporte intracelular até a superfície celular onde ele será empacotado e exteriorizado (figura 3) (HUTCHINSON; FODOR, 2013).

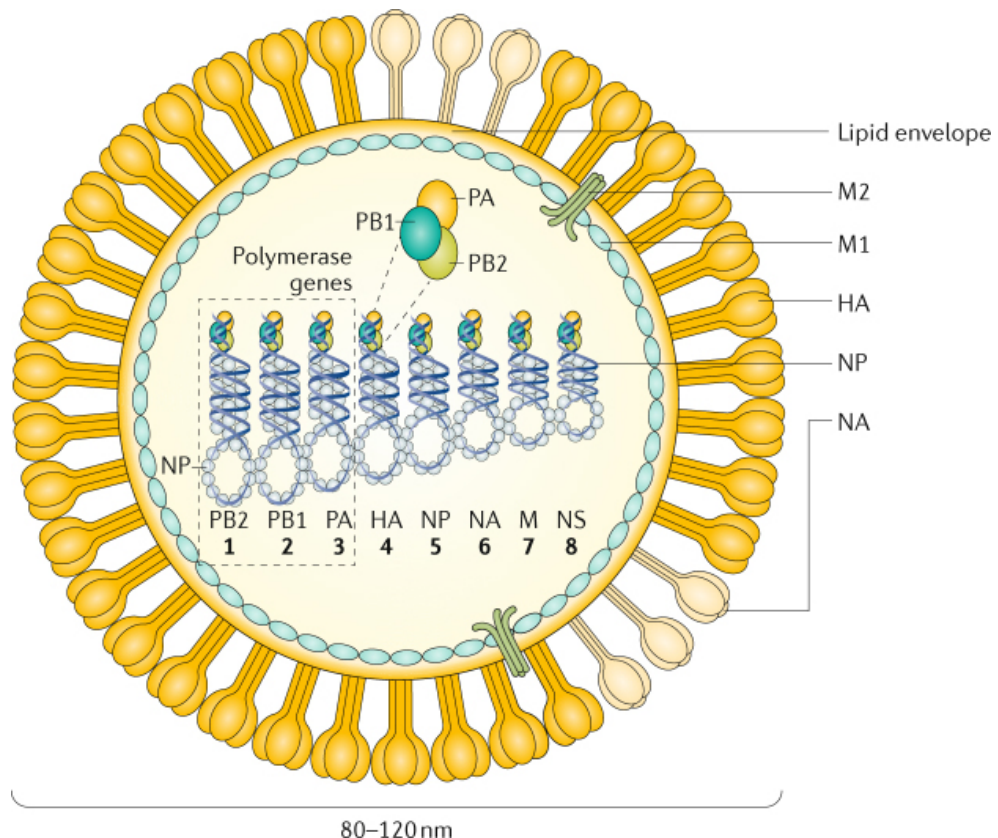


Figura 2 – Influenza A. A figura representa uma partícula viral, ou vírion. Composto por uma fita negativa de RNA com genoma contendo 8 segmentos localizado no interior da partícula viral. Os três maiores segmentos de RNA codificam as três subunidades de polimerase (PB1, PB2 e PA) que são responsáveis pela síntese de RNA e replicação do vírus nas células infectadas; dois segmentos de RNA codificam as glicoproteínas virais hemaglutinina (HA) que se liga ao ácido siálico da célula hospedeira e neuraminidase (NA) responsável pela saída do vírus da célula infectada auxiliando na disseminação viral. O genoma de RNA é ligado pelas neuroproteínas virais (NP) que são codificadas pelo segmento 5 de RNA. Os segmentos 6 e 8 codificam mais de uma proteína, chamadas de proteína matrix (M1), proteína de membrana (M2), proteína NS1 (não demonstrada) e proteína NS2 (NEP- *Nuclear Export Protein*). M1 é conhecida por promover o “esqueleto” estrutural e juntamente com NEP auxiliar no deslocamento do vírion dentro da célula; M2 é um canal de íon de prótons que auxilia na entrada do vírus na célula juntamente com HA e NA, localizadas na superfície do vírus ancorada em uma membrana lipídica derivada da célula infectada. NS1 é um fator de virulência responsável por inibir a resposta anti-viral da célula hospedeira (KRAMMER *et al.*, 2018).

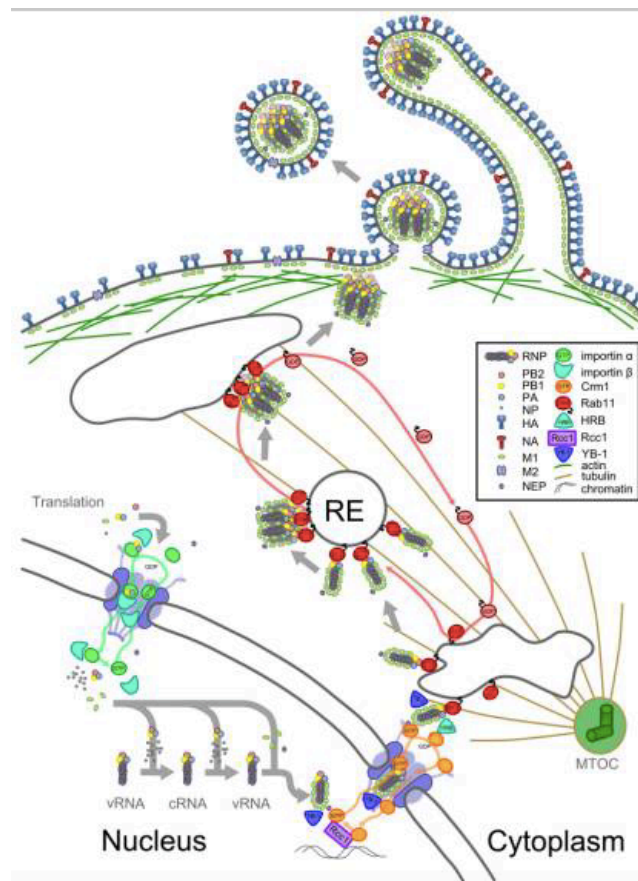


Figura 3 – Transporte dos RNPs da síntese até o empacotamento. Esquema demonstrativo do processo translocação dos RNPs para o núcleo, sua replicação e seu caminho até a membrana celular. Proteínas virais são transportadas para o núcleo das células infectadas (canto inferior esquerdo). Após sua síntese, RNPs se ligam a outros recém-sintetizado nos endossomo de reciclagem (RE) e são transportados para a membrana celular com o auxílio do MTOC (do inglês, *microtubule organising centre*). Na membrana celular os RNPs são empactados com outras proteínas virais formando os virions (HUTCHINSON; FODOR, 2013).

O padrão de nomenclatura da Influenza inclui o tipo de vírus (A, B ou C), sua origem geográfica, o número da cepa, ano de isolamento e o subtipo do vírus. Como por exemplo, o Influenza A/H1N1 isolado na Califórnia em 2009 é identificado da seguinte maneira: Influenza A/Califórnia/04/2009 (H1N1). A classificação dos subtipos desse vírus está relacionada à antigenicidade das duas principais glicoproteínas de superfície de suas células: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (SULLIVAN *et al.*, 2010).

Quando o vírus chega no trato respiratório inferior ele infecta as células do epitélio pulmonar e macrófagos alveolares (GROUSD; RICH; ALCORN, 2019) pela ligação do ácido siálico, presente na superfície das células, com a HA viral (EDINGER; POHL; STERTZ, 2014). Essa infecção desencadeia a ativação de morte celular por apoptose e necroptose (NOGUSA *et al.*, 2016; ZHANG, TING *et al.*, 2020), sendo que a virulência do Influenza A (IAV) é determinada justamente pela sua capacidade de impactar na diminuição do número dessas células, ou seja, quanto mais virulento maior a porcentagem de perda tanto de pneumócitos do tipo I quanto do tipo II (SANDERS *et al.*, 2013) (figura 4). A ativação do processo de apoptose em células infectadas também tem como objetivo controlar a replicação viral e, conseqüentemente, diminuir a propagação do vírus. Esse processo é particularmente importante quando o IAV “escapa” da ação antiviral dos IFNs. Esse escape é gerado por meio do aumento da expressão de sua proteína não-estrutural NS1. NS1 é uma proteína produzida em poucas horas após o início da infecção e tem como ação o bloqueio da transcrição de genes antivirais da imunidade inata por meio da sua ligação direta com o DNA da célula infectada (SHIM *et al.*, 2017).

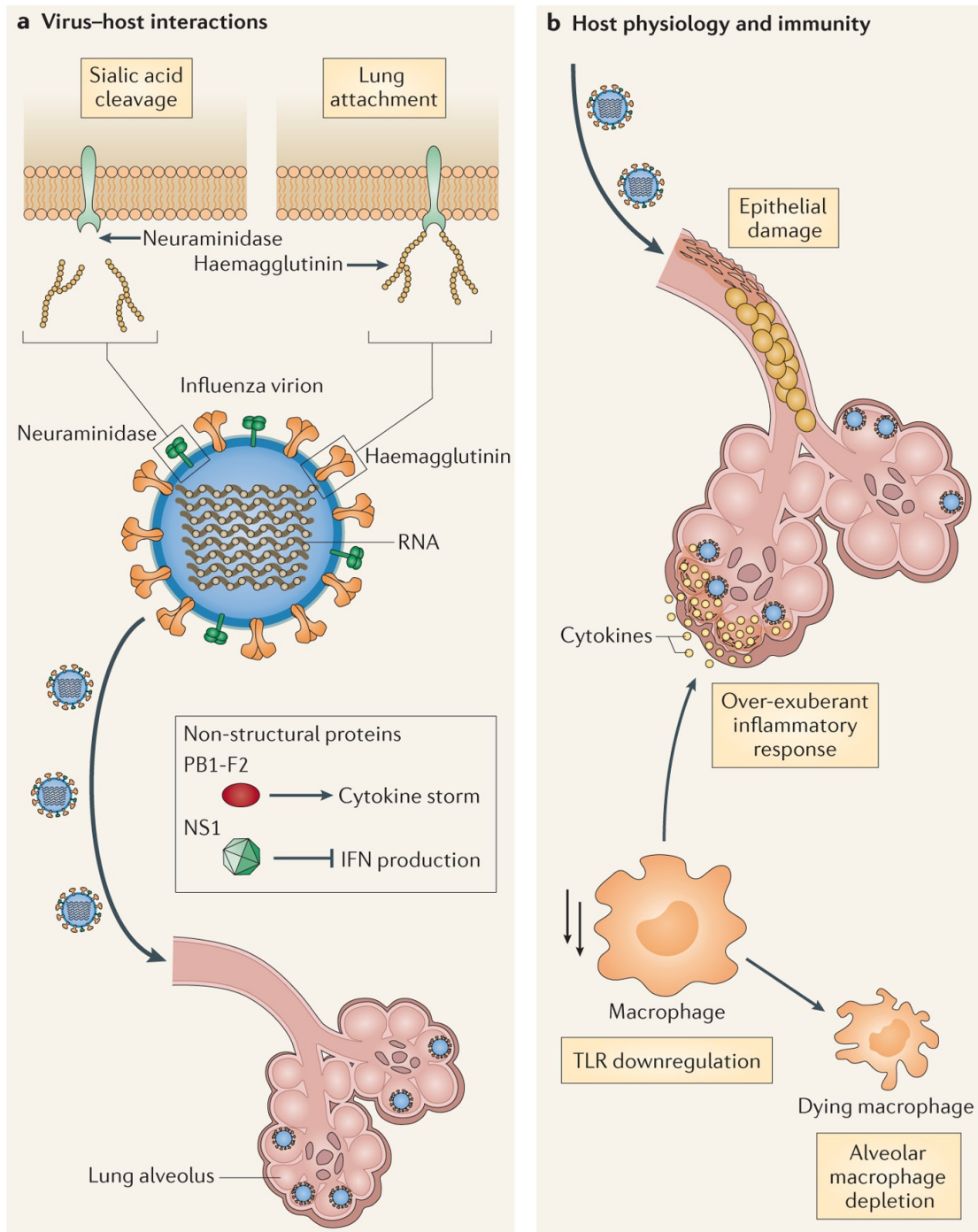


Figura 4 – Interação de IAV com as células pulmonares. O vírus entra na célula por meio da ligação da hemaglutinina de sua superfície com o ácido siálico na superfície da célula do hospedeiro (a). A infecção gera dano tecidual, ativação da resposta inflamatória e apoptose e depleção de macrófagos alveolares (b) (MCCULLERS, 2014)

Durante o processo de infecção e replicação viral o vírus Influenza A (IAV - *Influenza A virus*) é reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões ou RRP's (do inglês *pattern recognition receptors*, PRRs). Receptores como do tipo toll (TLRs – *toll-like receptors*)

reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), moléculas comuns expressas por diversos microrganismos, inclusive IVA, desencadeando a expressão de interferons (IFNs), citocinas importantes para a produção de proteínas antivirais (figura 5) (TAVARES; TEIXEIRA; GARCIA, 2017) .

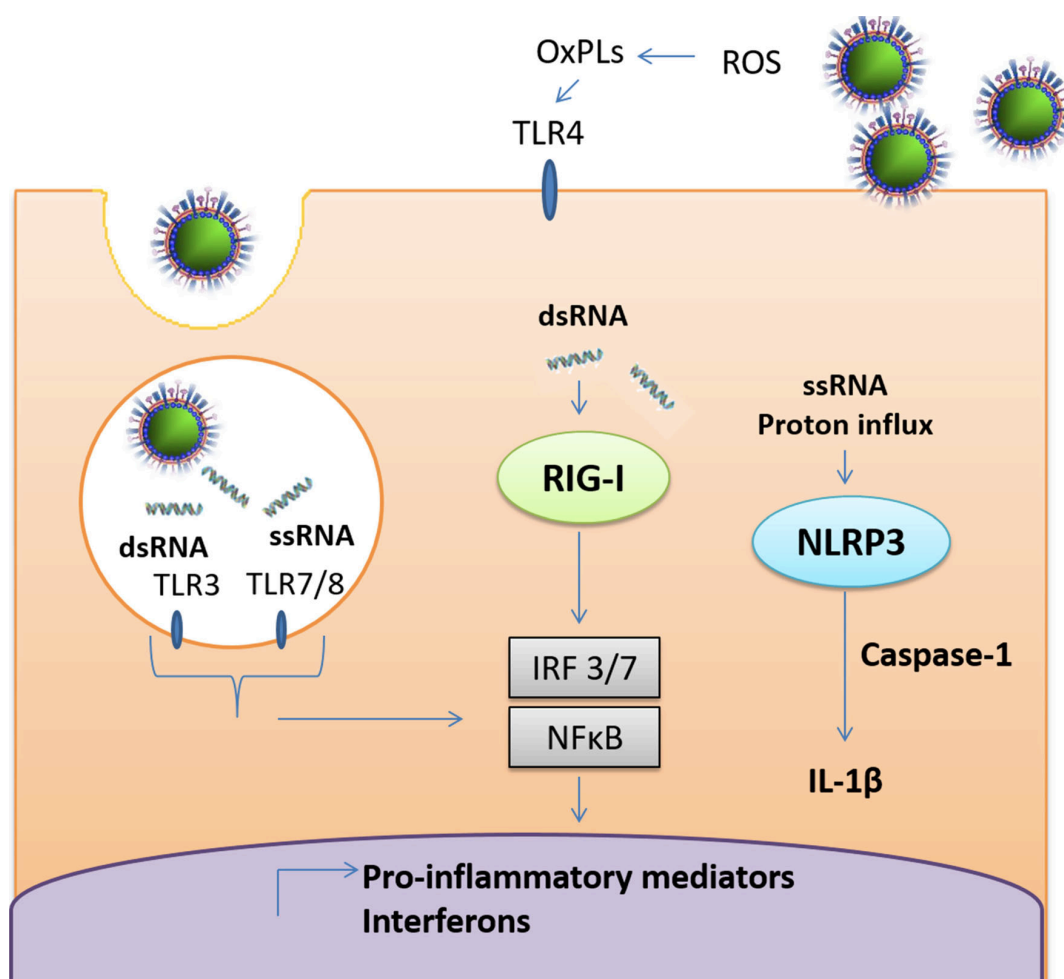


Figura 5 – Esquema demonstrativo do reconhecimento de PAMPs por PRRs. Após a entrada do vírus nas células, seu material genético é reconhecido por TLRs. Esses receptores também reconhecem fosfolipídios oxidados (OxPLs), produtos formados pela infecção por IAV. O reconhecimento desses PAMPs irá ativar fatores de transcrição que irão induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios. Além disso, o material genético do vírus pode ativar a ativação de canais de íon, aumentando o influxo de próton na célula e ativando o inflamassoma NLRP3 (TAVARES; TEIXEIRA; GARCIA, 2017).

TLRs são receptores, localizados na membrana plasmática das células e dentro de endossomos que reconhecem padrões moleculares de vírus, bactérias e fungos. O TLR3, por exemplo, é um receptor localizado no interior de endossomos e é capaz de detectar diversos RNA virais como o do vírus da Influenza (LE GOFFIC *et al.*, 2006; WANG, QIONG *et al.*, 2011). Esse receptor está presente nas células alveolares e nas células epiteliais dos brônquios,

assim como em várias células do sistema imune (GUILLOT *et al.*, 2005). Ao reconhecer o RNA viral, o TLR3 é ativado gerando uma cascata de ativação que irá culminar na produção de citocinas e quimiocinas importantes no combate ao vírus. De fato, a ausência de TLR3 está diretamente relacionado a gravidade da infecção por Influenza (HUO *et al.*, 2018; LIM, HYE KYUNG *et al.*, 2019; TOTURA *et al.*, 2015). Assim como o TLR3, os TLR7, 8 e 9, também são importantes receptores intracelulares responsáveis pelo reconhecimento e combate de infecções virais (ASCOUGH; PATERSON; CHIU, 2018).

Outro receptor importante no contexto de infecção por IAV é o TLR4. Ele é naturalmente expresso a níveis baixos na superfície das células alveolares e brônquicas mas sua expressão é aumentada durante a resposta inflamatória gerada pela infecção viral (GUILLOT *et al.*, 2004; MONICK *et al.*, 2003). Seu papel na infecção por IAV é tão importante quanto os TLRs intracelulares, como o TLR7 e 9, e se dá de maneira indireta, pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs – *damage associated molecular patterns*). Esse receptor reconhece fosfolipídios oxidados, originados pelo estresse oxidativo causado pela infecção (IMAI *et al.*, 2008). De fato, a importância desse receptor é validada pela presença de seus agonistas como adjuvantes em vacinas de Influenza (LI, ZHUOFAN *et al.*, 2021).

O reconhecimento de PAMPs e DAMPs na infecção por IAV é essencial para a ativação celular e para o influxo de células dando início ao processo inflamatório necessário no combate à infecção. Ao serem infectados, macrófagos e células do epitélio pulmonar reconhecem tais padrões moleculares e muitas vias intracelulares são ativadas, inclusive o inflamassoma NLRP3, um complexo de sinalização da resposta imune inata (KALIL; THOMAS, 2019a). Macrófagos infectados com IAV apresentam, 24 horas depois, um aumento na ativação de NLRP3, com aumento tanto da atividade de caspase-1 quanto de níveis de IL-1 β (LIU, HUI *et al.*, 2020). A via da ativação do inflamassoma NLRP3 ativa caspase-1 que é a enzima responsável pela clivagem do precursor de IL-1 β , pró-IL-1 β , gerando a sua forma ativada, a IL-1 β (SCHRODER; TSCHOPP, 2010) e esse processo é importante para o recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção (REN *et al.*, 2017).

Macrófagos e neutrófilos são as células que mais são recrutadas em pulmões infectados com IAV e animais nocautes para essas células apresentam maior título viral, sendo mais susceptíveis à doença com rápida perda de peso, pneumonia e morte (NARASARAJU *et al.*, 2011; TATE *et al.*, 2009). Além disso, animais que têm seus macrófagos alveolares depletados se tornam mais susceptível à infecção secundária por bactéria (GHONEIM; THOMAS; MCCULLERS, 2013).

Ao serem infectados, macrófagos alveolares são classicamente ativados -M1-, se tornando o subtipo mais presente nos primeiros dias da infecção e cruciais no combate à replicação viral (LI, KE; MCCAWE; CAO, 2021). Essas células são importantes não somente para a produção de proteínas antivirais, através da ação de IFNs produzido por elas, mas também pela produção de quimiocinas como CCL2, CCL5, MCP-1 e MIP-1 α , e de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18, importantes para o recrutamento de celular para o sítio infeccioso e ativação dessas células nesse local (JULKUNEN *et al.*, 2000; LEHMANN *et al.*, 1996). Porém, a super expressão de CCL2 e CCL5 está relacionada às formas graves da doença (RUDEMILLER *et al.*, 2016; TAVARES *et al.*, 2020). Os IFNs produzidos não só por essas células, mas também por células epiteliais pulmonares e por células dendríticas plasmocitoides ativam os chamados genes estimulados por IFNs (ISGs – *IFN stimulated genes*) essenciais para a produção de proteínas antivirais nos estágios iniciais da infecção (GILL *et al.*, 2018; SHIM *et al.*, 2017).

Dias após infecção, o número de macrófagos M1 decai progressivamente e os números de macrófagos alternativamente ativado - M2- começam a aumentar. Isso ocorre tanto devido à “repolarização” de macrófagos M1 em direção ao subtipo anti-inflamatório, M2, quanto devido ao aumento de monócitos não inflamatórios recrutados da corrente sanguínea (LI, KE; MCCAWE; CAO, 2021). Macrófagos M2 são células que estão presentes após a eliminação do antígeno e possuem um papel importante no bloqueio da inflamação, no reparo tecidual e no retorno do tecido à homeostase. Elas irão eferocitar neutrófilos apoptóticos liberando citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e pró-resolutiva, como TGF- β , e, ao mesmo tempo, inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β (GRABIEC; HUSSELL, 2016). Essas células, assim com as células T reguladoras (Tregs), são importantes não somente no bloqueio do recrutamento de células pró-inflamatórias, mas também, possuem um papel importante para o retorno do tecido à homeostase (BRENNAN *et al.*, 2018a; GRABIEC; HUSSELL, 2016; SUGIMOTO *et al.*, 2016). De fato, o aumento de macrófagos M2 nas vias aéreas de camundongos infectados com um subtipo letal do IAV foi correlacionado ao seu papel protetor na resposta inflamatória gerada pela infecção, prevenindo o aumento da taxa de mortalidade analisada (CHIDA *et al.*, 2020).

O balanço M1/M2 nas vias aéreas de animais infectados com IAV é determinante para o prognóstico da doença. A super expressão do fator de estimulação de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), três dias após a infecção por IAV, é capaz de redirecionar a ativação de macrófagos de M1 para M2 nas vias aéreas de animais infectados, diminuindo a letalidade

causada pelo vírus (HALSTEAD *et al.*, 2018). Da mesma forma, pacientes que possuem o quadro grave dessa doença, apresentam alta quantidade de macrófagos M1 no sangue periférico expressando altos níveis de TNF- α e depleção nos números de macrófagos M2 (COLE *et al.*, 2017).

O papel dos neutrófilos na infecção por IAV também tem sido estudado. A infiltração dessas células pode ser detectada nos estágios iniciais da infecção (TATE *et al.*, 2009; WHITE, MITCHELL R *et al.*, 2007) e são fontes importantes de quimiocinas, como a CXCL12, que são cruciais para o recrutamento de linfócitos T CD8 para as vias aéreas de animais infectados (LIM, KIHONG *et al.*, 2015; TATE *et al.*, 2012). Essas células fagocitam microrganismos presentes no tecido ativando a produção armadilhas extracelulares (NETs – neutrophil extracellular traps), liberadas por um processo denominado netose, que se ligam a microrganismos, impedindo que eles se espalhem, e garantindo uma alta concentração local de agentes microbianos (BRINKMANN *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2020). O aumento do recrutamento de neutrófilos para o local da infecção se dá pela produção de CXCL2 e CXCL8 e de CXCL10, que atua de maneira autócrina ativando vias de produção de substância antimicrobianas (SHORT *et al.*, 2014).

Curiosamente, apesar dessas células serem importantes nos estágios iniciais da doença elas também são usadas como “veículo” para replicação e disseminação do vírus em pacientes com H5N1, onde foram detectadas proteínas virais, como a HA, e RNA viral nessas células (ZHAO *et al.*, 2008). Por isso são um importante foco de estudo no entendimento da fisiopatologia dessa doença.

Um outro processo importante no curso da infecção por IAV é a ativação da eferocitose. Ela atua não somente na resolução da inflamação, mas também na ativação da resposta adaptativa. Lim K. *et al.* estudaram o efeito da eferocitose de neutrófilos na resposta imune adaptativa em um modelo de infecção por IAV na traqueia de camundongos. Eles observaram que nos estágios iniciais da doença, houve um aumento de neutrófilos e monócitos recrutados junto da diminuição de macrófagos residentes e células dendríticas. Após seis dias de infecção, os números de neutrófilo começaram a diminuir devido à ativação do processo de apoptose. Eles foram atraídos por um gradiente de concentração de CXCL2 liberadas por macrófagos residentes para serem eferocitados, mas, ainda naquele momento, percebeu-se um alto nível de replicação viral. A eferocitose de neutrófilos por monócitos recrutados mostrou ser essencial para a ativação de linfócitos T CD8 (LIM, KIHONG *et al.*, 2020), células importantes para

combater a infecção viral (HILLAIRE; RIMMELZWAAN; KREIJTZ, 2013; NÜSSING *et al.*, 2018).

As células TCD8⁺ são ativadas de maneira mais eficaz por meio da sua ligação com células TCD4⁺ (*T helper cells*). As células TCD4⁺, após serem ativadas pela apresentação de antígeno feita pelas células dendríticas, ativam uma via de co-estimulação necessária para a ativação de TCD8⁺, por meio da expressão de CD28, que também é necessária durante a fase efetora desses linfócitos citotóxicos (JOHNSON *et al.*, 2009; MORITA *et al.*, 2011). O auxílio para a ativação, não só das células TCD8⁺ mas também, das células produtoras de anticorpos – linfócitos B – se mostra, juntamente, por meio de mecanismos dependentes de IL-21 produzidas por células TCD4⁺ (SON *et al.*, 2021). TCD4⁺ apresentam um importante papel na prevenção dos quadros graves de pneumonia em humanos quando infectados por estirpes novas de IAV na ausência de anticorpos específicos (WILKINSON *et al.*, 2012).

Animais infectados com IAV produzem também as chamadas células de memória teciduais T CD8⁺ (CD8⁺ T_{RM}) as quais, em uma segunda infecção, são responsáveis pelo rápido *clearance* viral reduzindo o impacto causado por essa doença (DUAN *et al.*, 2015; WANG, ZHONGFANG *et al.*, 2015). A pandemia de 2009 trouxe mais oportunidades de determinação do papel dessas células na proteção contra IAV. De fato, a pré-existência de células TCD8⁺ produtoras de IFN γ em pacientes infectados foi associada a um menor índice de casos severos da doença (SRIDHAR *et al.*, 2013). Casos de hiperativação de células imunes inatas durante infecção pelo vírus H5N1 diminui a resposta de células TCD8⁺ atrasando o *clearance* viral e diminuindo os números de células T_{RM} nos pulmões de camundongos infectados, demonstrando a importância dessas células no combate ao vírus (KANDASAMY *et al.*, 2020).

Outras células linfoides, células T inatas, também estão envolvidas nos estágios iniciais da infecção impedindo que o vírus se espalhe. As células *natural Killer* (NKT), as células T $\gamma\delta$, invariáveis associadas a mucosa (MAIT) atuam ativando a produção de moléculas antivirais pela ação de IFNs produzidos por elas (NÜSSING *et al.*, 2018). Além disso, as células T $\gamma\delta$ são fontes de IL-17, citocina importante para ativar a resposta Th17, sendo essa crucial para combater à infecção (BAO *et al.*, 2019; MAROOF *et al.*, 2014). As células T $\gamma\delta$ participam também das etapas finais da infecção sendo cruciais nesse momento, já que a quantidade dessas células entre os dias 10-15 após infecção são maiores do que nos dias iniciais (CARDING *et al.*, 1990). Elas também produzem a IL-33, citocina que ativa células linfoides inatas (ILCs – innate lymphoid cells) (LAMICHHANE; SAMARASINGHE, 2019). As ILCs são classificadas em três subtipos: ILC1, ILC2 e ILC3. Elas atuam contribuindo na imunidade antiviral (ILC1 e

ILC3) (STIER *et al.*, 2017; VASHIST *et al.*, 2018), e também são importantes no reparo tecidual pós infecção sendo uma fonte valiosa de IL-5, citocina que contribui para o recrutamento de eosinófilos durante os estágio finais da infecção (GORSKI; HAHN; BRACIALE, 2013; MONTICELLI *et al.*, 2011).

Portanto, as células do sistema imune possuem um importante papel no curso da infecção por influenza e na virulência de cada subtipo desse vírus, bem como na severidade da doença (KALIL; THOMAS, 2019; SHIM *et al.*, 2017). De fato, a interação do vírus tanto com as células pulmonares quanto com as células do sistema imune irá determinar o desencadear da infecção. A Organização Mundial da Saúde estima, por ano, 1 bilhão de casos de infecção por influenza sendo que 3-5 milhões evoluem para casos graves com um numero de 300.000-500.000 mortes (KRAMMER *et al.*, 2018). Esses dados demonstram a relevância de estudos que visam minimizar as consequências geradas por essa infecção na saúde publica mundial.

1.2.2 Fibrose Pulmonar

Fibrose pulmonar é uma condição clínica que produz perda da capacidade respiratória com episódios de dispneia, tosse seca e hipoxemia, podendo levar a morte (CALZAS RODRIGUEZ; CARMEN JUAREZ MORALES; CASERO, 2016). Ela é caracterizada pela ativação crônica da resposta inflamatória pulmonar, com constante liberação de mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos que causarão a ativação e a diferenciação de fibroblastos intersticiais em miofibroblastos. Essa diferenciação terá como consequência a produção de componentes da matriz extracelular, dentre eles, a produção e deposição de colágeno no tecido, resultando na perda da complacência e função do órgão (LOMAS *et al.*, 2012).

A ativação do processo de fibrose pulmonar é observada em algumas doenças pulmonares inflamatórias crônicas. A inalação constante de cristais de alumínio, de silício e de titânio, tem como consequência a contínua indução de uma resposta inflamatória pulmonar que desencadeará uma posterior fibrose (BOMHARD, 2017). Doenças inflamatórias induzidas por alergênicos, como a asma crônica, também podem induzir a fibrose pulmonar. Essa é caracterizada por uma ativação permanente da inflamação pelo reconhecimento desses alergênicos, o que provocará a ativação de células pró-inflamatória, resultando no desenvolvimento de fibrose (VARSANO; SEGEV; SHITRIT, 2017). Além disso, pode-se observar um aumento na preocupação com o índice de desenvolvimento de fibrose causado pela

infecção por COVID-19. Apesar da prevalência da fibrose pós COVID-19 aparecer somente com o tempo, análises de tomografia computadorizada de alta resolução de pacientes que apresentaram a forma grave dessa infecção e que receberam alta hospitalar mostraram desordens pulmonares sugestivas de fibrose pulmonar (GEORGE; WELLS; JENKINS, 2020; OJO *et al.*, 2020). A fibrogênese pulmonar também pode surgir como efeito adverso da administração de medicamentos. Esse quadro clínico pode ser observado em pacientes submetidos ao tratamento com bleomicina, a qual se tornou a droga mais usada no modelo de indução da fibrose pulmonar em animais de experimentação (DELLA LATTA *et al.*, 2015).

Bleomicina é capaz de realizar quebra nas fitas de DNA na presença de O₂. Conseqüentemente, há produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de espécies reativas de nitrogênio (RNS) o que explica o efeito antineoplásico desse medicamento, pois, devido a isso, as células ativam seu mecanismo de morte. Uma única dose de BLM causa mudanças subcrônicas, enquanto que administrações recorrentes geram lesões duradouras, já que somente uma molécula do medicamento pode ser reutilizada e reativada. Em contraste às injeções intravenosas e intraperitoneais, as quais geram uma cicatrização pleural, a instilação (administração intranasal) de BLM gera acentuadas mudanças fibróticas nos bronquíolos respiratórios, inflamação alveolar e traqueal, ativação de macrófagos e fibroblastos, recrutamento celular para o espaço alveolar e intersticial e produção de interleucinas e quimiocinas (DELLA LATTA *et al.*, 2015).

Os níveis baixos da hidrolase de BLM (BLH) no pulmão, principalmente nos pneumócitos do tipo II juntamente com os efeitos de citocinas e radicais livres são capazes de gerar dano pulmonar induzido por BLM (BILI) (figura 6) (HAY, JOHN; SHAHZEIDI; LAURENT, 1991; WHITE, D A; STOVER, 1984), provocando vulnerabilidade das células ao efeito tóxico da BLM (ADAMSON; BOWDEN, 1979).

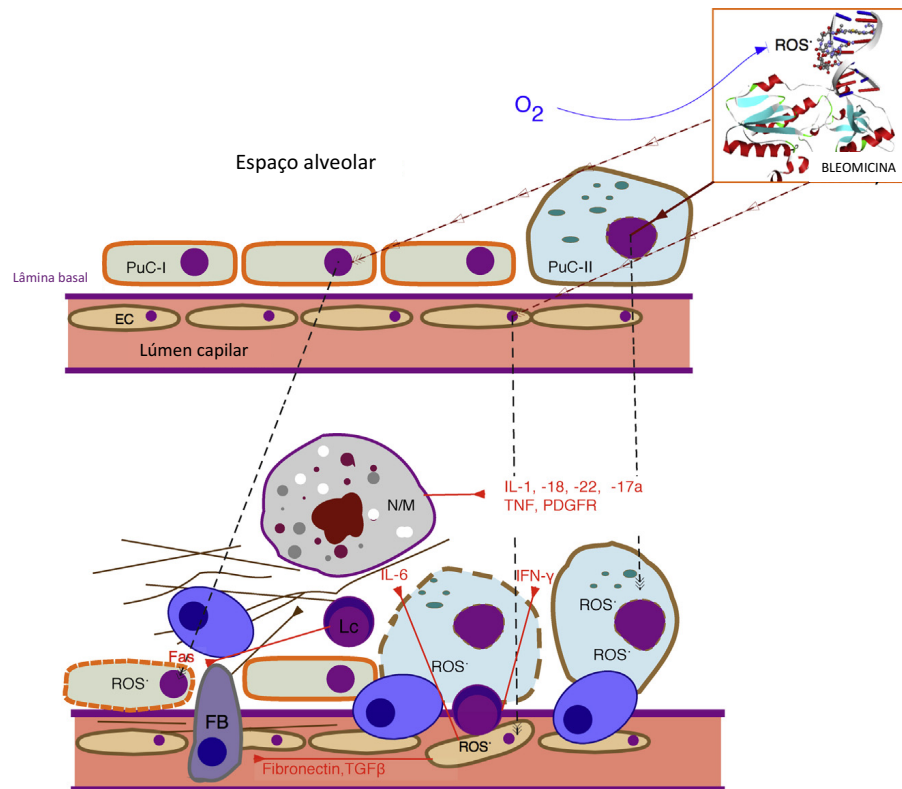


Figura 6. Esquema fisiopatológico do dano produzido por bleomicina. Dano genético das células pulmonares estimulando a produção de citocinas. Recrutamento celular dos capilares alveolares e ativação dos fibroblastos, sendo esses os responsáveis pela produção de colágeno no tecido pulmonar. Símbolos e abreviações: PuCI, pneumócito do tipo I; PuCII, pneumócito do tipo II; grânulos verdes, surfactante; EC, célula endotelial; N/M, neutrófilo/macrófago; Lc, linfócito; FB, fibroblasto; linhas contínuas marrons, fibrina; linhas laranjas pontilhadas, células apoptóticas; linhas contínuas vermelhas; produção. Adaptado (FROUDARAKIS *et al.*, 2013).

Sinais de dano pulmonar agudo (dano no epitélio alveolar, perda de surfactante e extravasamento de proteínas plasmática para o espaço alveolar) estão presentes na fibrose pulmonar sendo inicialmente limitados às células do interstício pulmonar. A inflamação aguda tem um papel importante no desenvolvimento dessa doença com um exsudato inflamatório que consiste, principalmente, de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (HAY, J G *et al.*, 1987) (figura 4).

No contexto de fibrose pulmonar, macrófagos teciduais secretam citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-18 (HOSHINO *et al.*, 2009), IL-22 e IL17a (SONNENBERG; FOUSER; ARTIS, 2010) e células endoteliais secretam IL-6 (SAITO *et al.*, 2008; SCHEULE *et al.*, 1992). As citocinas ativam os linfócitos que provocam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais facilitando o recrutamento de células inflamatórias através do endotélio; influxo no espaço intersticial e dano de células endoteliais por meio da via Fas-FasL (KUWANO *et al.*, 1999). Nesse contexto, necrose local dos pneumócitos do tipo I e indução

de metaplasia em pneumócitos do tipo II também podem ser observadas juntamente com infiltrados inflamatórios (MOORE; HOGABOAM, 2008; MOURATIS; AIDINIS, 2011).

Neutrófilos são as primeiras células responsivas na inflamação aguda derivadas da circulação. Elas respondem ao estímulo de várias quimiocinas e interleucinas (IL) sendo que a IL-8 (ou CXCL8) é a principal quimioatraente dessas células. De fato, células progenitoras de endotélio de pacientes com Fibrose pulmonar idiopática (do inglês, *Idiopathic pulmonary fibrosis* - IPF) e produzem IL-8 se comparado a pacientes que não possuem a doença. Juntamente com o aumento da produção dessa quimiocina pôde-se observar um maior recrutamento de neutrófilos *in vivo* em modelo animal. Esse fato também foi observado no plasma de pacientes com IPF onde havia uma elevada quantidade de neutrófilos assim como altos níveis de IL-8 (BLANDINIÈRES *et al.*, 2019). Entretanto, em camundongos, o bloqueio do recrutamento neutrofílico por meio da inibição dessa citocina gerou uma diminuição do desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por BLM comprovando o papel fundamental dessas células na progressão dessa doença (GSCHWANDTNER *et al.*, 2017).

No sítio inflamatório, os neutrófilos são responsáveis pela produção e liberação de produtos importantes na ativação do processo pró-fibrótico, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e elastase. Esses produtos ativarão macrófagos e fibroblastos com consequente liberação de TGF- β e produção de colágeno (GREGORY *et al.*, 2015; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014)

Uma vez responsivos, os macrófagos adquirem uma vasta capacidade plástica de fenótipos e possuem um papel central no reparo tecidual. Macrófagos alternativamente ativados após sua exposição à IL-4, IL-10 e IL-13 (GORDON; MARTINEZ, 2010; WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013), passam a apresentar propriedades pro-fibróticas por meio da secreção de diversos fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e TGF- β (DURU; WOLFSON; ZHOU, 2016). De fato, o número de macrófagos com esse fenótipo, alternativamente ativados, está aumentado nos pulmões de camundongos com fibrose pulmonar induzida por BLM, contribuindo para a formação de matriz extracelular pela ativação da síntese de colágeno (AYAUB *et al.*, 2017). Além disso, essas células são capazes de produzir metaloproteinases que auxiliam, não somente na degradação da matriz extracelular, mas também na migração de fibroblastos, o que irá resultar em uma exacerbada deposição de colágeno no pulmão (LI, GUANQUN *et al.*, 2019).

Fibroblastos são células derivadas de fibrócitos e são ativados precocemente na fibrose pulmonar pelo estímulo da fibronectina, a qual é produzida devido ao dano das células do endotélio ou devido ao estímulo gerado por citocinas, como TNF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF- β 1 (SCHMIDT *et al.*, 2004). A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos ocorre durante o processo de fibrose. As quatro fontes de miofibroblastos são: fibroblastos residentes do tecido, fibrócitos circulantes que são atraídos para as regiões de lesão pulmonar, células epiteliais do pulmão por meio da transição mesenquimal-epitelial (EMT) e células endoteliais pela transição mesenquimal-endotelial (EndEMT) quando essas células se convertem em um fenótipo fibroblastóide (*“Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment”*, 2000).

O recrutamento e a proliferação/diferenciação de células no pulmão podem ser induzidos por uma variedade de mediadores extracelulares ou pela combinação deles. Pode-se citar as citocinas TGF- β (fator de crescimento transformador beta), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (ALTINTAS *et al.*, 2016), IL-1 β (interleucina 1 beta) e a quimiocina CCL5 (RUSSO *et al.*, 2009).

As citocinas IL-1 β e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias que possuem atividades semelhantes e atuam em conjunto. O TNF- α tem como principal fonte de produção, células mononucleares ativadas (BORRIELLO *et al.*, 2017). Sua principal função é o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o sítio inflamatório. Ele faz com que as células do endotélio vascular expressem moléculas de adesão, possibilitando a ligação das mesmas com células sanguíneas. Devido a isso o recrutamento leucocitário ocorre, inicialmente para os neutrófilos e subsequentemente para linfócitos e monócitos. O TNF- α atua em fagócitos mononucleares, estimulando a produção de IL-1 β o que auxiliará no recrutamento celular. Pode agir no hipotálamo induzindo febre, sendo, portanto, chamado de pirógeno endógeno (derivado do hospedeiro). A febre é mediada pelo aumento da síntese de prostaglandinas por células hipotalâmicas. Quando em grandes quantidades, produz a inibição do movimento contrátil do miocárdio e de tônus da musculatura lisa, o que resulta na perda exacerbada da pressão sanguínea, ou choque. Essa citocina também causa trombose intravascular devido à perda das propriedades anticoagulantes normais do endotélio (AKDIS *et al.*, 2011).

TNF- α é uma citocina inflamatória importante, pois promove resposta inflamatória e subsequente fibrose durante resposta pulmonar induzida por BLM. Estudo anterior comprova que a depleção dessa citocina por meio de anticorpo, atenua a lesão pulmonar em modelos de BLM (PIGUET *et al.*, 1993). Níveis altos dessa citocina podem ser observados ao longo dos

dias em que a fibrose pulmonar é induzida, tornando sua presença indispensável nesse processo (LEE, YE JI *et al.*, 2012; RUSSO *et al.*, 2011; ZHANG, X *et al.*, 2015).

Em semelhança ao TNF- α , a IL-1 β tem como função principal mediar a resposta inflamatória. Sua principal fonte celular assim como o TNF- α são fagócitos mononucleares ativadas. A produção de IL-1 β pelos fagócitos mononucleares é induzida por produtos bacterianos como LPS (lipopolissacarídeo), e por outras citocinas, como o TNF- α . Diferentemente do TNF- α , a IL-1 β possui outras fontes de produção além dos macrófagos. Ela pode ser produzida por neutrófilos, células epiteliais (ex. queratinócitos) e células endoteliais. IL-1 β age nas células endoteliais para aumentar a expressão de moléculas de superfície que auxiliam na adesão de leucócitos, como ligantes para integrinas. Induz febre, síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda por células hepáticas e produção de neutrófilos e plaquetas pela medula óssea (AKDIS *et al.*, 2011).

Em modelo de fibrose pulmonar induzida por BLM em camundongos, IL-1 β apresenta papel importante na indução de processos pró-inflamatórios e pró-fibróticos sendo observada em níveis elevados nos quatorze primeiros dias da indução juntamente com níveis igualmente altos de TNF- α . A explicação para os efeitos biológicos semelhantes entre essas duas citocinas é que seus receptores ativam cascatas intracelulares com proteínas homólogas e ativam os mesmos fatores de transcrição (YARA *et al.*, 2001).

Como citado previamente, o papel de moléculas quimiotáticas na fibrose pulmonar é relevante. Quimiocinas são moléculas de estrutura homóloga que possuem como função biológica a movimentação dos leucócitos regulando sua migração do sangue para o tecido. A nomenclatura *quimiocina* é uma contração de “citocina quimiotática”. As quimiocinas podem ser produzidas por várias células devido, ou não, a um estímulo inflamatório. São lipéptídeos que possuem duas alças dissulfetos internas. Divididas em quatro famílias, as quimiocinas são separadas em relação ao número e à localização dos resíduos de cisteína N-terminais. As CC e CXC são as duas principais famílias de quimiocinas. A primeira possui dois resíduos de cisteína adjacentes e a segunda possui um aminoácido entre esses resíduos. Elas são produzidas por leucócitos e vários tipos de células teciduais como células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Sua liberação pode ser causada pelo contato com microrganismos - por meio da sinalização com TLR, e por citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 β e TNF- α (BACHELERIE *et al.*, 2014; MURPHY *et al.*, 2000).

CCL5/RANTES é um agente quimioatraente para linfócitos e media o influxo dessas células para o pulmão. Os linfócitos apresentam um papel relevante no processo de fibrose

pulmonar por meio do seu acúmulo. Nesse processo, a quimiocina é produzida por macrófagos residentes do pulmão que, ao serem ativados, recrutam os linfócitos para o tecido contribuindo assim para a progressão do infiltrado inflamatório (PETREK *et al.*, 1997). Esse agente quimiotático pode ser observado nos pulmões de animais tratados com BLM a partir do segundo dia após instilação permanecendo em quantidades elevadas até o vigésimo quinto dia (RUSSO *et al.*, 2009, 2011).

Estudos têm demonstrado que em animais com fibrose pulmonar, o TGF- β está aumentado (AHLUWALIA; SHEA; TAGER, 2014; COVVEY; MANCL, 2014). É considerado um agente chave no processo de fibrose, já que estimula a produção de matriz extracelular, diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e inibição da autofagia em fibroblastos (COVVEY; MANCL, 2014; DATTA; SCOTTON; CHAMBERS, 2011; MAHER; ADAMALI, 2012). Esse subtipo pode ser encontrado em animais submetidos a indução de fibrose pulmonar por BLM, sendo encontrado no pulmão a partir do dia quatro até o dia vinte e oito após instilação do fármaco (BURGY *et al.*, 2016; YOON *et al.*, 2013; ZHANG, X *et al.*, 2015).

Alguns estudos têm demonstrado que durante o processo de reparo, a expressão de TGF- β 1 fica aumentada e estimula a transcrição de genes COL1A1 e COL1A2, os quais podem conduzir à um aumento anormal da deposição do colágeno tipo 1 (COL1) (AZAMBUJA *et al.*, 2005; WHITE, D A; STOVER, 1984). Alguns dos efeitos pró-fibróticos de TGF- β 1 e a ativação da expressão de COL1 podem ser mediados por CTGF, uma proteína da matriz extracelular que age como mediador central da remodelagem tecidual e fibrose e é altamente expressa na fibrose pulmonar induzida por BLM (DE LENA *et al.*, 1972; KEIJZER; KUENEN, 2007).

Exposição pulmonar contínua à BLM pode gerar um crescimento na síntese de colágeno e deposição de várias proteínas de matriz extracelular incluindo colágeno, elastina e proteoglicano (REISER *et al.*, 1986). Além disso, pode ativar também macrófagos teciduais que são estimulados a produzir ácido hialurônico, uma molécula tecidual de conexão que está presente em pulmões fibrosados (ADAMSON; BOWDEN, 1979). Linfócitos T também estão envolvidos no dano pulmonar mediado por inflamação. Eles são responsáveis pela secreção de citocinas durante sua fase inflamatória Th1 (como por exemplo o interferon- γ - INF- γ) ou na fase Th2 (como por exemplo a IL-13) que modula a expressão de fatores de crescimento ativados pela família STAT de fatores de transcrição (BONNER, 2010).

Na clínica, nos estágios iniciais da fibrose pulmonar, testes de função pulmonar se encontram alterados, sendo a capacidade de difusão pulmonar (D_{LCO}) o indicador mais sensível

de diagnóstico. Apesar de que a diminuição do D_{LCO} não seja específica para pacientes com BILI, a diminuição de $D_{LCO} > 40\%$ é comumente aceitável, como um sinal de alerta para a interrupção do tratamento com BLM. A diminuição do volume pulmonar, tal como a capacidade pulmonar total e a diminuição da capacidade vital com um volume expiratório forçado em 1 segundo (FEV1), define uma síndrome restritiva típica de pacientes com BILI e está associada com alcalose respiratória e diminuição da pO_2 e pCO_2 (pressão de oxigênio e de gás carbônico, respectivamente) (LUURSEMA *et al.*, 1983). Radiografia do tórax pode acusar consolidação bilateral combinada por infiltrados intersticial e alveolar, possibilitando também a constatação de alterações pleurais (WHITE, D A; STOVER, 1984). A tomografia de alta resolução do tórax é o teste ouro para constatar achados intersticiais e alveolares (ROSSI *et al.*, 2000).

Até então, estratégias clínicas, que mimetizem o surgimento da fibrose pulmonar em pacientes submetidos a tratamento quimioterápicos, para aumentar a qualidade de vida desses indivíduos, tem sido motivo de estudo. Entretanto, o procedimento clínico indicado ainda é o transplante de pulmão, o que torna relevante o estudo e desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento dessa condição clínica (LOMAS *et al.*, 2012).

1.3 Resolução e moléculas pró-resolutivas

Resposta inflamatória aguda é um processo protetivo que idealmente deve ser local e culminar em retorno à homeostase (figura 7) (SUGIMOTO *et al.*, 2019a). Caso contrário, esse processo pode resultar na ativação crônica do processo inflamatório tendo como consequência um quadro de fibrose tecidual e perda de função do órgão fibrosado.

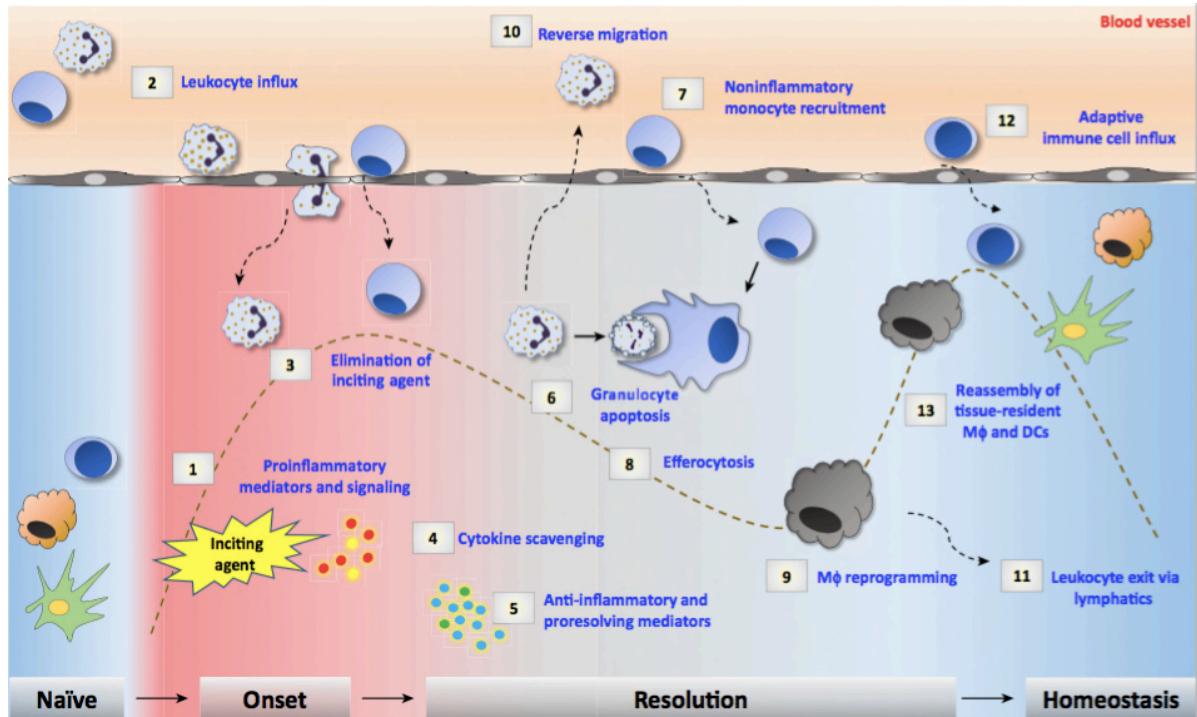


Figura 7 – Curso da resposta inflamatória. Após serem ativadas pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs (estímulo), as células residentes são ativadas produzindo citocinas pró-inflamatórias (1) que serão essenciais para o recrutamento de leucócitos circulantes (2), os quais serão fundamentais para a eliminação do estímulo (3). Após a eliminação desses estímulos, células inflamatórias ativam seu processo de morte celular e passam a expressar sinais de “eat me” (4) que serão reconhecidos por macrófagos derivados de monócitos não inflamatórios circulantes. Esses macrófagos irão eferocitar essas células apoptóticas aumentando a produção de moléculas anti-inflamatórias e pró-resolutivas no tecido o que irá ativar a sua reprogramação para um subtipo alternativamente ativado – M2 (5-9). Células não apoptóticas saem do tecido por migração reversa (10) ou por vasos linfáticos (11). Após a resolução, o tecido é “repopulado” com o influxo de células do sistema imune adaptativo (12) e com macrófagos e células dendríticas (13). Essa homeostase é conhecida como “homeostase adaptada”, uma vez que as células que ali se encontram já se encontram responsivas a um segundo estímulo (SUGIMOTO *et al.*, 2019a).

Após o pico de infiltração de polimorfonucleares (PMN) para o tecido inflamado, tem-se o início da fase de resolução com biossíntese de moléculas pró-resolutivas especializadas (SPM – *specialized pro-resolving mediators*) responsáveis pelo bloqueio do recrutamento de células pró-inflamatórias e produção das citocinas derivadas dessas células (SERHAN, CHARLES N; LEVY, 2018a). Essas moléculas, da família das lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas, são também responsáveis pela reprogramação macrofágica para o subtipo M2 (alternativamente ativado) para que essas células realizem a eferocitose de PMNs apoptóticos no local (SERHAN, CHARLES N, 2010; SERHAN, CHARLES N; SAVILL, 2005) (figura 8).

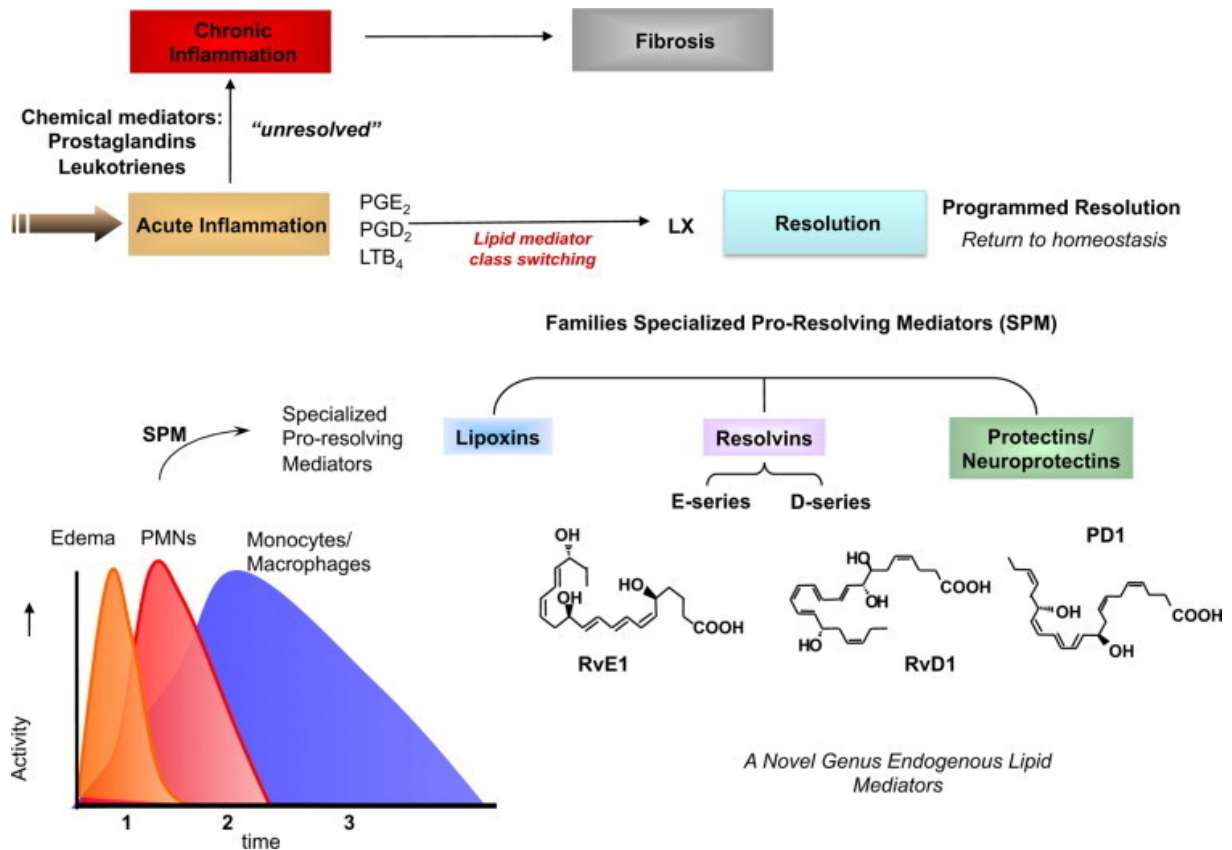


Figura 8 – Resolução da inflamação. O resultado ideal da inflamação é a sua resolução com retorno à homeostase. A homeostasia tecidual é alcançada por meio da troca de classes de mediadores lipídicos pró-inflamatórios para mediadores pró-resolutivos especializados (SPM). Os SPMs fazem parte das famílias das lipoxinas, resolvinas e protectinas (SERHAN, CHARLES N; LEVY, 2018a).

Nas fases iniciais no processo inflamatório, há uma produção elevada de leucotrienos e prostaglandinas que amplificam a resposta inflamatória aguda (CAI, TING *et al.*, 2019; SASTRE *et al.*, 2021; WILEY *et al.*, 2019). Essas moléculas são fundamentais para uma eficiente resposta inflamatória, uma vez que animais deficientes para leucotrieno B_4 , por exemplo, se tornam mais susceptíveis a infecção (PERNET *et al.*, 2019). Durante a fase resolutive da inflamação ocorre a “troca de classe” de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (figura 9)(SERHAN, CHARLES N; LEVY, 2018).

Mediadores pró-resolutivos devem apresentar características como: bloquear a infiltração de PMN no tecido; contra regular a produção e ação de citocinas pró-inflamatórias; induzir o processo de apoptose nos PMN e sua posterior eferocitose por macrófagos; ativar o recrutamento de monócitos não inflamatórios e polarização de macrófagos para o subtipo alternativamente ativado; induzir o retorno de células não apoptótica via vasos linfáticos ou vasos sanguíneos; aliviar dor; estimular a regeneração tecidual; induzir a repopulação tecidual para um estado de “homeostasia adaptada” (SUGIMOTO *et al.*, 2019a).

Além de mediadores lipídicos, outras moléculas têm sido estudadas pelas suas propriedades pro-resolutivas, como mediadores proteicos – anexina A1, AMPc (AMP cíclico) e GILZ (*Glucocorticoide-Induced Leucine Zipper*) (GL *et al.*, 2020; MG *et al.*, 2020; VAGO *et al.*, 2021). Alguns desses mediadores têm demonstrado ser essenciais no controle da resposta inflamatória em diversos modelos experimentais em camundongos (D *et al.*, 2020; MACHADO *et al.*, 2020; RUIZ; VIGNE; POT, 2019). Galvão *et al.*, demonstrou o papel da anexina A1 (AnxA1) na resposta inflamatória induzida por gota. Eles observaram que quando animais knockout (AnxA1^{-/-}) para esse pró-resolutivo tiveram seus joelhos inflamados pela injeção de cristais de MSU, o recrutamento de neutrófilo para o joelho desses animais foi significativamente maior se comparado aos animais WT. Além disso, animais AnxA1^{-/-} apresentaram um atraso na resolução demonstrado pela diminuição da apoptose neutrofílica e sua eferocitose (GALVÃO *et al.*, 2017). Em um outro estudo, Vago *et al.* demonstrou a relevância da expressão de AnxA1 em um contexto de resolução. Eles mostraram que a população de macrófagos que apresentou diminuição na sua capacidade de fagocitar neutrófilos apoptóticos, também tiveram diminuição da expressão de AnxA1 e CD206 (marcador específico para M2), mostrando assim a importância dessas moléculas em um cenário pró-resolutivo (VAGO *et al.*, 2019). Em um outro estudo, Vago *et al.* demonstrou o papel de GILZ na reprogramação de macrófagos e eferocitose. A ausência de GILZ aumentou a quantidade de macrófagos classicamente ativados, M1, *in vivo* e *in vitro*, assim como aumentou citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α e diminuiu IL-10 nos experimentos *in vitro*. Além disso, animais injetados com LPS e tratados com GILZ, apresentaram diminuição dos números de macrófagos M1 e aumento de eferocitose se comparado aos animais não tratados mostrando que GILZ é um importante regulador da função macrofágica e de eferocitose, sendo ambos passos importantes para a resolução da inflamação (VAGO *et al.*, 2020).

Outros estudos têm demonstrado o uso de moléculas pró-resolutivas como medida terapêutica em animais no contexto de infecção pulmonar por influenza e pneumocócica (MELO *et al.*, 2021); isquemia e reperfusão renal (H *et al.*, 2020); trombose (CHERPOKOVA *et al.*, 2019); fibrose (GJ; EJ; CH, 2020) e artrite (LC *et al.*, 2017). Em humanos, Souza *et al.* estudou o efeito da suplementação com óleos marinhos na concentração de SPM plasmáticas desses indivíduos. Seu estudo demonstrou que indivíduos que receberam a suplementação com o óleo tiveram um aumento da concentração plasmática de SPMs. Esses indivíduos também apresentaram diminuição da expressão de moléculas de adesão em leucócitos e também aumento da capacidade fagocítica de neutrófilos e macrófagos (SOUZA *et al.*, 2020).

O papel de SPM *in vitro* também tem sido estudado. Estudos mostram que macrófagos classicamente ativados, M1 (polarizado pela ação de IFN γ ou LPS) apresentam aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, prostaglandina E2 e prostaglandina D2 (BUCZYNSKI *et al.*, 2007; DALLI; SERHAN, 2012). Já macrófagos alternativamente ativados, M2, possuem aumento da expressão de mediadores pró-resolutivos, como por exemplo resolvinas, maresinas, protectinas e lipoxinas (DALLI; SERHAN, 2012). De fato, moléculas pró-resolutivas possuem um papel importante na polarização de macrófagos. De Carvalho Santuchi *et al.*, mostrou que, *in vitro*, quando macrófagos foram estimulado com LPS e então tratados com angiotensina-(1-7), essas célula apresentaram uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias (DE CARVALHO SANTUCHI *et al.*, 2019). *In vivo*, o papel dessas moléculas na polarização de macrófagos também já foi demonstrado em diversos modelos de experimentação animal (AN *et al.*, 2019; CHIANG *et al.*, 2019; MAGALHAES *et al.*, 2018; RYMUT *et al.*, 2020).

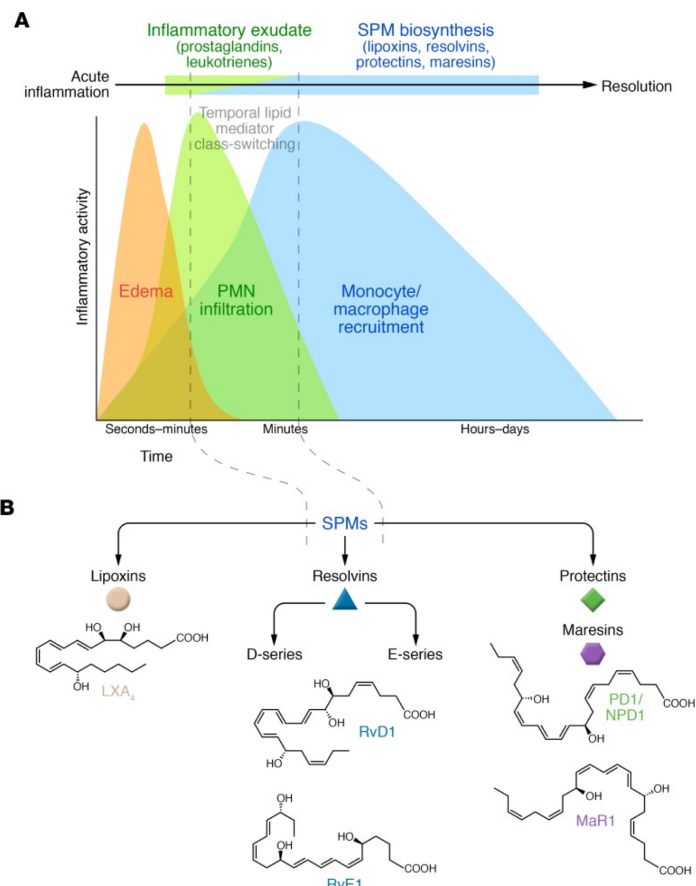


Figura 9 – Troca de classe de mediadores lipídicos. No início do processo inflamatório há um aumento de edema e infiltrado de células inflamatórias assim como produção de mediadores como leucotrienos e prostaglandinas. Com o passar do tempo, ocorre a troca de classe desses mediadores gerando diminuição do recrutamento células inflamatórias e aumento do recrutamento de monócitos não inflamatórios (a). Os SPM são estruturalmente distintos e possuem potentes ações pró-resolutivas (b) (SERHAN, CHARLES N; LEVY, 2018a).

As moléculas pro-resolutivas possuem um papel não somente na resposta imune inata, mas também, na resposta imune adaptativa. Chiurchiu *et al.* mostraram em seu estudo que SPMs, tais como resolvinas e maresinas, apresentaram a capacidade de reduzir a produção de citocinas por linfócitos TCD8, TCD4 e Th17 ativados. Esses mediadores foram tanto capazes de reduzir a diferenciação de linfócitos TCD4 em Th1 e Th17 quanto capazes de aumentar a diferenciação dessas células em linfócitos Treg (CHIURCHIÙ *et al.*, 2016); fato também observado em um estudo com GILZ (BABAN *et al.*, 2017). De fato, a biossíntese de mediadores lipídicos é importante para a diferenciação de linfócitos TCD4 em Tregs uma vez que a ausência da enzima 15-lipoxigenase (enzima de uma das vias do metabolismo do ácido araquidônico que dá origem às lipoxinas) diminui a diferenciação de linfócitos T *naives* em Treg, e aumenta, em contrapartida, a diferenciação dessas células em Th1 (MARQUES *et al.*, 2021).

Uma vez que mediadores pró-resolutivos possuem papéis importantes na regulação da inflamação, orquestrando não somente a resposta imune inata, mas também adaptativa, essas moléculas se tornaram foco em estudos que buscam novas opções terapêuticas no tratamento de doenças inflamatórias.

1.3.1 Angiotensina 1-7

O sistema renina-angiotensina (RAS) (figura 5) é conhecido como um sistema hormonal envolvido no controle dos níveis de sal e água e no controle da pressão sanguínea. Evidências experimentais e clínicas indicam que a ativação do RAS pulmonar está diretamente ligada à fisiopatologia da fibrose pulmonar (ARTAUD-MACARI *et al.*, 2013; ASHCROFT; SIMPSON; TIMBRELL, 1988). Angiotensina II (AngII) é um peptídeo desse sistema, gerado pelo metabolismo da angiotensina I por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA), que se liga ao receptor de AngII do tipo 1 (AT1R). É um importante mediador pró-fibrótico que induz proliferação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblasto (CARNESECCHI *et al.*, 2011; KREUTZ *et al.*, 1996). Essa diferenciação causará a síntese de colágeno (ASHCROFT; SIMPSON; TIMBRELL, 1988; GOODWIN; JENKINS, 2009) por meio da produção de TGF- β , um importante mediador da fibrogênese (CAI, GUO-QIANG *et al.*, 2010). Além disso, AngII está envolvida na inflamação pulmonar por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de citocinas pró-inflamatórias (CHEN *et al.*, 2013; COOK *et al.*, 2010).

Em contraste, ECA2, uma enzima homóloga à ECA, foi descoberta pela sua

capacidade de metabolizar AngII, dando origem ao heptapeptídeo denominado angiotensina 1-7 [Ang-(1-7)]. Dessa forma, o eixo ECA2/ Ang-(1-7) consiste em novos componentes do RAS que contra regula o eixo ECA/AngII/AT1R (A. *et al.*, 2017).

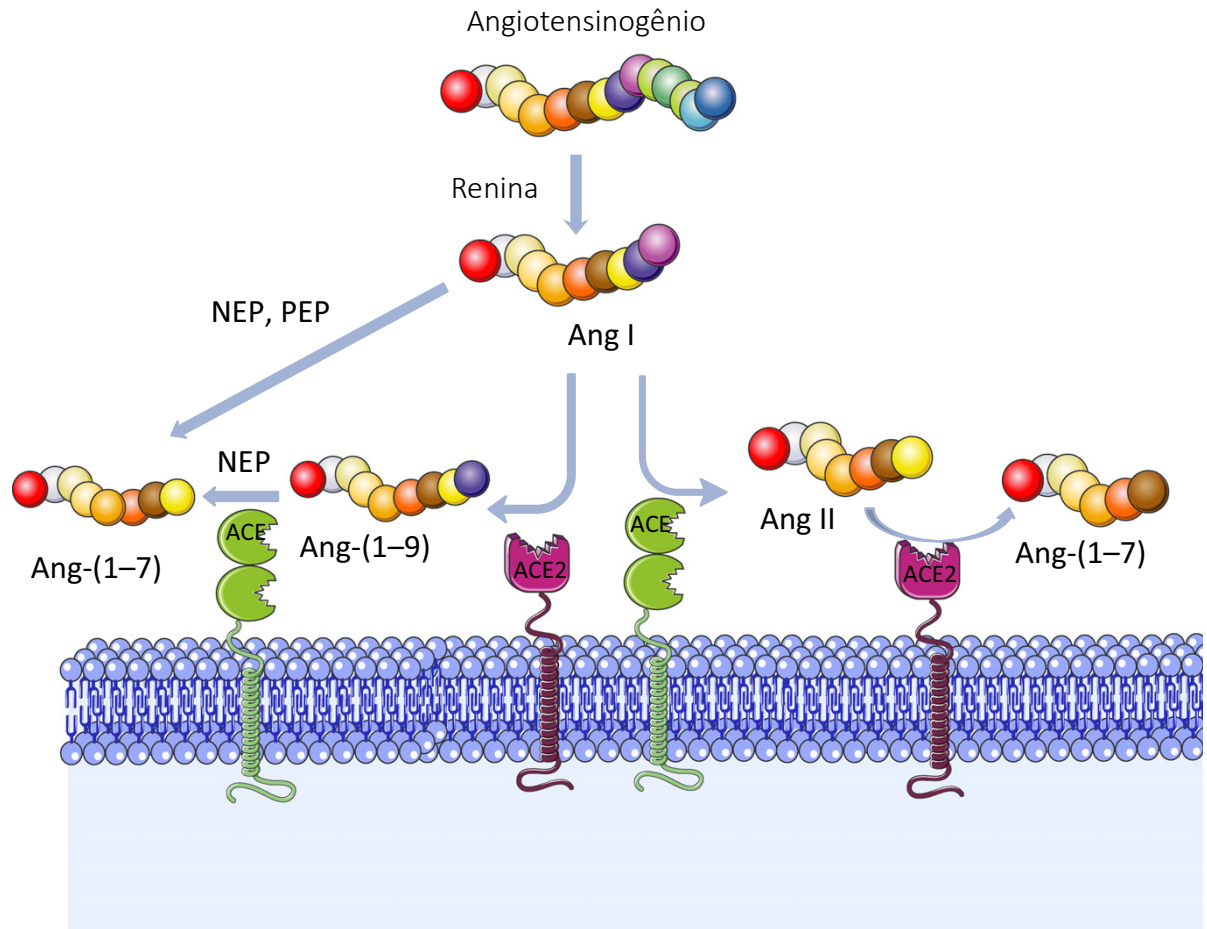


Figura 10. Esquema simplificado do sistema renina angiotensina (RAS). Abreviações: ACE, enzima conversora de angiotensina; ACE2, enzima conversora de angiotensina 2; Amp, aminopeptidase; Ang I, angiotensina I; Ang II, angiotensina II; Ang-(1-7), angiotensina 1-7; Ang-(1-9), angiotensina 1-9; NEP, endopeptidase neutra; PEP, Prolil endopeptidase. Adaptado de Silva D. *et al.*, 2016. Adaptado. (PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015b).

Os efeitos da atividade anti-inflamatórias e antifibróticas da Ang-(1-7) vem sendo estudado. W. Lu *et al.*, estudaram o efeito do tratamento com Ang-(1-7) em que ratos com dano renal causado por apnéia do sono obstrutiva. Os ratos tratados apresentaram uma supressão na produção de espécies reativas de oxigênio, redução da inflamação renal e diminuição da fibrose renal. Efeitos benéficos do tratamento foram associados com a redução do estresse oxidativo celular, além de reduzir a inflamação e a fibrose (LU *et al.*, 2017). Em outro estudo foi demonstrado o

efeito anti-inflamatório de um agonista do receptor de Ang-(1-7) em um modelo de arteriosclerose em camundongos. Foi observado que o pré tratamento com o agonista do receptor de Ang-(1-7) (AVE0991) inibiu a inflamação perivascular por meio da redução da expressão de quimiocinas e citocinas como IL-1 β , TNF- α , MCP-1 and CXCL10, impedindo a ativação de monócitos/macrófagos e sua diferenciação para o fenótipo M1. Também foi observado a inibição da migração de monócito do tipo THP-1 no animais tratados (SKIBA *et al.*, 2016).

O papel da Ang-(1-7) na inflamação foi descrito no artigo abaixo.



Angiotensin 1-7 and Inflammation

Izabela Galvão, Flavia Rago, Isabella Zaidan Moreira,
and Mauro Martins Teixeira

Introduction

Inflammation is a physiological response of tissues to noxious stimulation of infectious nature or not. The immune system senses noxious stimuli and initiates an inflammatory process that ultimately aims to remove the threat and restore tissue structure and function homeostasis. Both processes, i.e., the initiation of the response and its resolution, are actively mediated by release of mediators of inflammation and recruitment and function of leukocytes and other cell types, including endothelial cells and tissue structural cells such as fibroblast [13, 32].

Acute inflammation has rapid onset and short duration. It is characterized initially by exudation of fluid and plasm proteins. During acute inflammation, cells from the innate immune system recognize damage or pathogen-associated molecular patterns. Recognition of these molecules by receptors on the surface of innate immune cells triggers several cellular responses, which result in the production of pro-inflammatory mediators (cytokines and chemokines) and consequent leukocyte recruitment to the site of injury, where they are able to deal with the inciting stimulus and initiate the repair of tissue damage. During acute inflammation, leukocyte accumulation is characterized predominantly by neutrophils [16].

Acute inflammation is induced and controlled by mediators produced by the host cells. These mediators act in the blood vessel to induce reversible changes, such as increased blood flow into the affected tissue, vessel dilatation, increased adhesiveness of leukocyte to the endothelial line, and increased permeability of capillaries and venules to plasm protein and fluid. All these changes are responsible for the

I. Galvão · F. Rago · M. M. Teixeira (✉)
Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

I. Z. Moreira
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

cardinal signs of inflammation, as described by Celsus in the first century: Calor (heat), rubor (redness), tumor (swelling), dolor (pain). In the nineteenth century, Rudolf Virchow added the last cardinal sign: *functio laesa* (loss of function) [32].

In most cases, the acute inflammatory response is controlled in intensity, self-limited and accompanied by full restoration of tissue architecture and function. Once the stimulus that triggers inflammation is eliminated, activated cells and mediators are removed and degraded. This is normal resolution of inflammation. If the inciting stimulus is not properly eliminated or tissue injury is prolonged or excessive, the result can be the chronification of inflammation with serious consequences. Chronic inflammation is characterized by influx of lymphocytes and macrophages associated with vascular proliferation and fibrosis, and is seen in diseases such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis and asthma [58]. During resolution of inflammation, biosynthesis of active mediators promotes the return to homeostasis by acting on specific targets to inhibit the neutrophil recruitment to the site of inflammation and promote the activation of apoptosis (programmed cell death in the recruited effector leukocytes), efferocytosis (clearance of apoptotic cell by macrophage), and reprogramming of macrophages from a pro-inflammatory to a resolutive phenotype. [46]. There has been much recent interest in the discovery of novel mediators of resolution of inflammation, as it is appreciated that there is much to be understood in the biology of resolution.

One of the endogenous mediators that has been studied in the context of inflammation is Angiotensin 1-7 (Ang-(1-7)). Ang-(1-7) is a biologically active peptide synthesized from the action of ACE2 on Angiotensin I (Angio I) and Angiotensin II (Angio II). It binds to a 7-transmembrane G-protein-coupled receptor, MAS, and exerts many beneficial actions in the context of acute inflammation. In this chapter, we will summarize the relevance of Ang-(1-7) and its MAS receptor in the context of inflammation, highlighting the advances and potential clinical use of this system for the treatment of inflammatory diseases.

The Evidence for the Anti-Inflammatory Actions of Angio-(1-7)

The renin-angiotensin system (RAS) is a very complex and dynamic system, composed of a cascade of enzymes and peptides that are believed to play an important role in many physiological processes such as blood pressure regulation and water balance [54]. The RAS has been described to participate in two opposite axes: one acting on AT₁ receptors mediating pro-inflammatory effects and another one acting on Mas receptors mediating anti-inflammatory effects [35]. Angiotensin II (AngII) has pro-inflammatory and pro-fibrotic effects caused by the activation of its AT₁ receptor. On the other hand, AngI and AngII can be cleaved by Nephilysin and angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), respectively, generating Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)]. Ang-(1-7) binds to its Mas receptor activating anti-inflammatory and anti-fibrotic processes [11, 33]. AngI can also undergo the action of the ACE 2 to produce Ang-(1-9) which binds on AT₂ receptor and exerts anti-inflammatory actions [40]. Ang-(1-9) may form Ang-(1-7) through ACE in a less efficient way ([12, 61]

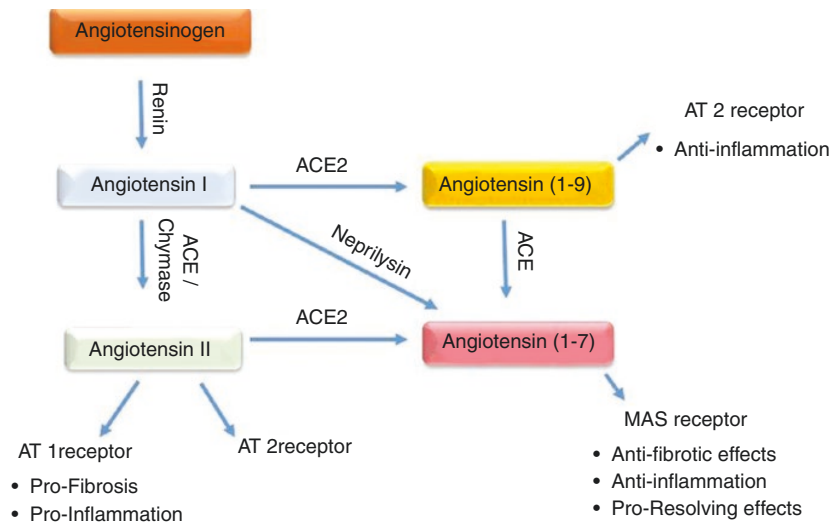


Fig. 1 Ang-(1-7) formation and the renin-angiotensin system in the context of inflammation. ACE angiotensin converting enzyme, ACE2 angiotensin converting enzyme 2, AT1 receptor angiotensin receptor type 1, AT2 receptor angiotensin receptor type 2, MAS Mas receptor

(Fig. 1). Other recently found end-products of RAS system besides Ang-(1-7) and Ang-(1-9) include Ang-(1-5), Ang A, Ang III, Ang IV and alamandine [3].

There is much evidence to link the function of the renin-angiotensin system (RAS) and that of the immune system. Much initial work was focused on the ACE/AngII/AT₁ axis until we suggested that the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis could also play a role in the context of inflammation [51, 52]. While the action of the ACE/AngII/AT₁ axis is mostly pro-inflammatory and pro-fibrotic, the action of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis is mostly anti-inflammatory and anti-fibrogenic [54].

The effects of Ang-(1-7) have been studied in several disease models in which there is an inflammatory component [7, 14, 27, 28, 43, 44, 56]. These data are summarized in Table 1.

In an Arthritis model, the treatment with Ang-(1-7) decreased neutrophils recruitment and increased efferocytosis of apoptotic human neutrophils by macrophages [4]. In a DSS-induced colitis model, Ang-(1-7) was able to reduce inflammation by modulating plasma levels of cytokines and chemokines such as IL-1 α , TNF- α , IL-5, IL-6, IL-13, GM-CSF, M-CSF, C5/C5a, MCP-5, and MIP-1. Daily treatment with Ang-(1-7) previously improved the severity of colitis, showed a significant reduction in the circulating levels of several cytokines and chemokines, and recruitment of neutrophils into the colon tissue [20].

In acute lung injury (ALI) model, Ang-(1-7) reduced lung edema, myeloperoxidase activity, histological lung injury score, and pulmonary vascular resistance [21]. Besides that, Ang-(1-7) reduced the release of pro-inflammatory cytokine and

Table 1 Studies evaluating the relevance of Ang-(1-7) and its MAS receptor in the context of inflammation

Organ/model	Compounds or strategy used	Effects	References
Hepatic fibrosis	A779	↑ Levels of OH-proline and TGF-β	[44]
Ischemia/reperfusion injury	Expression of ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis	↓ Levels of mRNA of Ang-(1-7) and ACE2 ↑ ↑ Expression of Mas receptor	[53]
Lung fibrosis and pulmonary hypertension	Lentivirus (Lenti-ACE2 or Lenti-Ang-(1-7))	↓ Lung fibrosis ↓ Levels of TGF-β ↓ Levels of TNFα, IL-6 and IL-1β	[49]
Arthritis	Ang-(1-7), AVE0991 and Mas receptor null mice	↓ Neutrophils accumulation ↓ Levels of TNFα, CXCL1, and IL-1β ↓ Histological parameters ↑ Levels of TNF-α, CXCL1, and neutrophils accumulation	[53]
Asthma	Ang-(1-7) and A779	↓ Recruitment of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, and macrophage ↓ Fibrosis Prevented the improvement caused by Ang-(1-7) treatment	[12]
Renal ischemia/reperfusion (I/R)	AVE0991 and Mas receptor null mice	↓ Levels of CXCL1 ↓ MPO ↓ Tissue damage No effect in I/R model	[9]
Atherosclerosis	AVE0991	↓ CD86, CD80, CD40 in macrophage and dendritic cells ↓ CD69 expression in CD4+ T cells	[18]
Hyperalgesia model	Ang-(1-7)	↓ Nociception	[10]
High-fat diet (HFD)-induced hepatic steatosis	Ang-(1-7)	↓ Levels of IL-6 and TNF-α	[14]
Acute lung injury model	Ang-(1-7)	↓ Lung edema ↓ MPO ↓ Histological score ↓ Pulmonary vascular resistance	[21]
Asthma	AVE0991	↓ Levels of IL-5 ↑ Levels of IL-10	[48]
Intracranial aneurysms	Ang-(1-7)	↓ Levels of MMP-9 and TNF-α ↑ Levels of HGF and COX-2	[43]

Table 1 (continued)

Organ/model	Compounds or strategy used	Effects	References
Ehrlich's ascites carcinoma (EAC)	Ang-(1-7)	↓ Tumor weight and levels of IGF-1 and VEGF	[1]
Lung Fibrosis	Ang-(1-7)	↓ Lung fibrosis ↓ Levels of CTGF and collagen I ↓ Levels of TNF- α and IL-6	[34]
Type 2 diabetes (db/db)	Ang-(1-7)	↓ Renal fibrosis ↓ Reactive oxygen species ↓ Macrophage infiltration	[38]
Lung fibrosis	Ang-(1-7) and lentivirus (Lenti-ACE-2)	↓ Collagen deposition ↓ Production of NOX4 protein and H ₂ O ₂ ↓ Production of NOX4 and H ₂ O ₂ ↓ Levels of ACE and AT1R	[33]
Intracranial aneurysms	Ang-(1-7)	↓ Levels of IL-1 β and TNF- α	[50]
Hyperalgesia model	Ang-(1-7)	↓ Peripheral nociception	[8]
Chronic allergic lung inflammation	Ang-(1-7)	↓ Levels of IgE ↓ Total number of cells ↓ Levels of IL-4, IL-5, GM-CSF, CCL5, and CCL2 ↓ Histology score of inflammation ↓ Collagen deposition ↓ Pulmonary vascular hyperplasia/hypertrophy	[31]
Acute respiratory distress syndrome	Ang-(1-7)	↓ Recruitment of leukocytes ↓ Collagen deposition	[68]
Autoimmune encephalomyelitis (EAE)	Mas receptor deficiency and AVE0991	↑ M(LPS/INF γ) profile genes ↓ M(IL-4/IL-13) gene expression ↑ T cells proliferation ↓ M(LPS/INF γ) expression ↑ M(IL-4/IL-13) expression	[17]
Chronic allergic pulmonary inflammation	Mas receptor deficiency	↑ Total cells ↑ Levels of eosinophils and mononuclear cells ↑ Histology score of inflammatory cells infiltrate ↑ IL-13/TNF- α , CCL2/MCP-1, and CCL5/RANTES ↑ Deposition of airway extracellular matrix	[29]

(continued)

Table 1 (continued)

Organ/model	Compounds or strategy used	Effects	References
Type 2 diabetes (db/db)	Ang-(1-7)	↓ Fibrosis ↓ IL-1 β ↓ Macrophage infiltration in the lungs ↓ Oxidative stress	[42]
Atherosclerosis	AVE0991	↓ Macrophage, T cells and NK cells recruitment ↓ CCL2, CCL5, CXCL10, TNF- α and IL-6 ↓ M1 population	[55]
High salt (HS) diet	Expression of ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis and on the expression of ACE/AngII/AT1R axis	Expression of ACE2 and Mas receptor ↑ Expression of AngII and AT1R	[7]
Antenatal corticosteroid (ANCS) treatment	Expression of AngII and Ang-(1-7)	↑ Urinary AngII ↑ Urinary AngII/Ang-(1-7) ↑ Plasma Ang-(1-7)	[56]
Renal injury	Ang-(1-7)	↓ Oxidative stress ↓ Extracellular matrix proteins ↓ Levels of CTGF and TGF- β ↓ Fibrosis ↓ IL-6 and TNF- α	[27]
Cardiomyopathy	Adenovirus carrying the murine ACE2 (Ad-ACE2)	↑ Survival rate ↑ Expression of ACE2 ↓ Recruitment of inflammatory cells, loss of myofibrils, and disorganization ↓ Cell death ↑ pAMPK(Thr172)/AMPK, pP13K/P13K, and pAKT/AKT ratio ↓ c-caspase3/caspase3 ratio ↓ VCAM, TNF- α , and ICAM-1 ↓ p-ERK, NOX2, P47, and iNOX ↓ Collagen deposition and TGF- β ↑ MMP-9	[28]
Diabetic cardiomyopathy	AT1 inhibition (Azilsartan)	↑ Expression of ACE2 and Mas receptor ↓ Oxidative stress cardioprotection	[59]

Table 1 (continued)

Organ/model	Compounds or strategy used	Effects	References
Arthritis	Ang-(1-7) and A779	↑ Apoptosis of neutrophils ↓ NFκB activation ↑ Efferocytosis of apoptotic neutrophils blocked the effects of Ang-(1-7) treatment	[4]
Arthritis	Expression of ACE2 and Ang-(1-7)	↓ Levels of cardiac and kidney ACE2 and Ang-(1-7) NSAIDs restored the levels of cardiac Ang-(1-7)	[2]
Asthma	Ang-(1-7)	↓ Levels of eosinophils ↓ EPO activity ↓ Apoptosis eosinophils ↑ Efferocytosis is PMN cells ↓ Levels of NFκB ↓ ERK1/2, IκB-α, and GATA3 ↓ Extracellular matrix deposition ↓ Collagen I and collagen III mRNA	[30]

Legend: A779 antagonist of Mas receptor, Ang I angiotensin I, Ang II angiotensin II, Ang(1-7) angiotensin 1-7, ACE angiotensin converting enzyme, ACE2 angiotensin converting enzyme 2, AT1 angiotensin receptor type 1, AVE0991 nonpeptide agonist of Mas receptor, MAS Mas receptor, MMP9 matrix metalloproteinase, EPO eosinophilic peroxidase, TGF-β transforming growth factor beta, TNF-α tumor necrosis factor alpha, IL interleukin, CXCL chemokine, MMP-9 matrix metalloproteinase 9, HGF hepatocyte growth factor, COX-2 cyclooxygenase 2, IGF-1 insulin growth factor 1, VEGF vascular endothelial growth factor, CTGF connective tissue growth factor, AT1R angiotensin II receptor type 1, GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, LPS lipopolysaccharides, INF-γ interferon gamma, c-caspase 3 cleaved caspase 3, VCAM vascular cell adhesion protein 1, ICAM1 intercellular adhesion molecule 1, MMP-9 matrix metalloproteinase 9, NFκB factor nuclear kappa B, NSAIDs nonsteroidal anti-inflammatory drugs

suppressed the expression of Nox4 and its subunits in the lungs in a model of hypoxia [26]. In a model of pulmonary fibrosis, treatment with Ang-(1-7) decreased lung fibrosis, the production of type I collagen, and the production of connective tissue growth factor (CTGF). In addition, it decreased the levels of TNF-α and IL-6 [34].

In asthma models, Ang-(1-7) reduces the production of pro-inflammatory cytokines and the activation of downstream pathways. For example, the treatment of Ang-(1-7) decreased immune cells recruitment and fibrosis [12]; decreased the levels of erythropoietin (EPO) activity in the lung; increased apoptotic eosinophils and its efferocytosis; induced resolution of inflammation by the down-expression of ERK1/2, IκB-α and GATA3 [30]. The treatment with Ang-(1-7) prevented the increase of plasma IgE and pro-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-5, GM-CSF,

CCL5 and CCL2 in lungs of OVA-challenged mice. These effects were associated with reduced levels of p-ERK1/2 and p-JNK in lungs [31].

In a mouse model of type 2 diabetes (db/db), treatment with Ang-(1-7) reduced the levels of circulating pro-inflammatory cytokines, decreased lung fibrosis, oxidative stress and macrophage infiltration in the lungs [42]. Mori et al., [38] suggested that Ang-(1-7) represents a promising therapy for diabetic nephropathy by exerting renoprotective effects associated with reduction of oxidative stress, inflammation and fibrosis. Similar results were observed by Lu et al., [27], where the treatment with Ang-(1-7) reduced oxidative stress, extracellular matrix proteins, pro-inflammatory cytokines and fibrosis in a renal injury model. Ang-(1-7) also induced neuroprotection by reduction of TNF- α and IL-1 β levels, attenuation of oxidative stress and reduction of phosphorylation of I κ B and NF κ B p65 subunit [19].

Further studies are needed to elucidate the mechanisms by which Ang-1-7 cooperates with other mediators to modulate inflammation. Nevertheless, current knowledge do support the possibility that drugs which mimic or enhance the function of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis may be beneficial for the treatment of inflammatory diseases [54].

Further evidence for the relevance of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis in the control of inflammatory response derives from studies using the compound AVE 0991, a nonpeptide Mas receptor agonist [47]. It has been demonstrated that AVE0991 treatment decreased neutrophil accumulation and pro-inflammatory cytokines production in a model of arthritis [53]. During renal ischemia and reperfusion, the administration of AVE 0991 promoted renoprotective effects, such as decrease of tissue injury, leukocyte infiltration and release of CXCL1 [9].

Treatment with AVE 0991 significantly reduced disease incidence and slightly ameliorated the clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [17]. In a model of spontaneous atherosclerosis, the use of a nonpeptide Ang-(1-7), AVE 0991, inhibited perivascular inflammation by reducing chemokine expression and monocyte/macrophage activation [55] and also reduced the expression of co-stimulatory molecules in macrophage and dendritic cells, consequently reducing T-cell activation [18]. The use of AVE0991 in a murine model of asthma reversed the increased airway wall and pulmonary vasculature thickness, reduced IL-5 and increased IL-10 levels [48].

Moreover, there is evidence to suggest that that Ang-(1-7) has anti-nociceptive effects by Mas receptor activation. Besides the blockage of hypernociception in arthritis [53], Ang-(1-7) attenuated cancer-induced bone pain [15]. Inhibition of Mas receptor improved neuropathic pain [70] and the absence of Mas receptor reduced hyperalgesia induced by carrageenan and prostaglandin E2 [10]. Other studies also demonstrated that Ang-(1-7) has an anti-nociceptive role via Mas receptor activation [8, 10].

In contrast to the overall anti-inflammatory effects of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis, the ACE/AngII/AT₁ axis is, in general, associated with pro-inflammatory and pro-fibrotic responses [54]. In this regard, blockade of the ACE/AngII/AT₁ axis is expected to have anti-inflammatory effects. The activation of AT1 can be inhibited through specific and competitive angiotensin II receptor blockers (ARBs)

called sartans. Sartans, together with inhibitors of ACE, are efficient inhibitors of the ACE/AngII/AT₁ axis [60]. Interestingly, some of the anti-inflammatory effects observed after treatment with losartan were dependent on Ang-(1-7)/Mas receptor. The long-term administration of losartan exerts an antithrombotic effect mediated by Ang-(1-7) [22] and treatment with telmisartan and losartan effectively increased the plasma levels of Ang-(1-7) [71]. In a model of Adriamycin-induced renal injury, the protective effects of losartan were ablated in Mas receptor-deficient mice ([51] PLOS one), whereas the effects of this compound were Mas receptor-independent in a model of antigen-induced arthritis [51, 52]. These studies clearly show that blockade of the ACE/AngII/AT₁ axis may decrease inflammation by facilitating the release of An-(1-7) and activation of Mas receptors.

In addition to the biological effects of Ang-(1-7) in the context of different animal models of human diseases, several studies have now shown that Ang-(1-7) through its MAS receptor may modify the function of cells associated with the inflammatory response (Table 2). Akin to the in vivo data, most studies in cell types

Table 2 Studies of Ang-(1-7) effects on MAS receptor in different cell types associated with inflammation

Cell type	Compounds or strategy used	Effects	References
Human lung adenocarcinoma cells (AS49)	Ang-(1-7)	↓ Cell migration ↓ MMP-2 mRNA expression. ↓ P13K/Akt, JNK1/2 and p38MAPK phosphorylation	[39]
Peritoneal macrophage	Ang-(1-7)	↓ IL-6 and TNF-α mRNA levels ↓ Src kinases activity	[57]
Astrocytes	Ang-(1-7)	↓ IL-1β and IL-6mRNA. ↓ COX-2 and GFAP protein expression ↑ DUSP1	[36]
Skeletal muscle cells	Ang-(1-7)	↓ AngII-induced TGF-β1 ↓ AngII-induced ROS and NOX subunit p47/phox protein levels ↓ AngII-induced p38, and smad-2 phosphorylation, and smad-4 nuclear translocation	[37]
Rat pancreatic acinar AR42J cells	Ang-(1-7) and A779	↑ Levels of IL-10 ↓ IL-6 and IL-8. ↑ <i>Levels of IL-6 and IL-8 P13K/AKT pathway and eNOS</i>	[63]
Human brain vascular smooth muscle cells (HBVSMC)	Ang-(1-7) and A779	↓ NFκB ↑ IκBα ↓ TNF-α, MCP1, IL-8 <i>Blocked Ang-(1-7) effects</i>	[5]
Umbilical vein endothelial cells (HUVECs)	Ang-(1-7) and A779	↓ ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 expression and secretion ↓ NFκB and p38 activation <i>Blocked Ang-(1-7) effects</i>	[24]

(continued)

Table 2 (continued)

Cell type	Compounds or strategy used	Effects	References
Human vascular smooth muscle cells	Ang-(1-7) and A779	↓ iNOS elicited by IL-1 β , and this effect was blocked by A779 ↓ NF- κ B activation - blocked Ang-(1-7) effects	[62]
Vascular smooth muscle cells (VSMCs)	Ang-(1-7) and A779	↓ IVSMC proliferation induced by Ang II ↓ AngII-induced Akt and ERK1/2 phosphorylation <i>Blocked Ang-(1-7) effects</i>	[69]
Bone marrow-derived macrophage (BMDM)	AVE 0991	↑ Alternative activated macrophage ↓ T cell activation mediated by macrophage	[17]
Microglia	Ang-(1-7)	↓ IL-1 β and TNF- α mRNA levels ↑ IL-10 mRNA levels ↓ Expression of NF- κ B subunits	[25]
Human peripheral blood isolated neutrophils	Ang-(1-7)	↑ Apoptosis ↓ NF κ B activation	[4]
Bone marrow-derived neutrophil and spleen-derived mononuclear cells	Ang-(1-7) and A779	↑ Neutrophil and mononuclear cells apoptosis ↓ Neutrophil chemotactic migration ↓ Superoxide release by neutrophils <i>Blocked Ang-(1-7) effects</i>	[20]
THP-1 Monocyte/macrophage	AVE 0991	↓ TNF- α , IL-1 β , CCL2, and CXCL-10mRNA ↓ Monocyte/macrophage activation and migration ↓ Differentiation in M1 phenotype	[55]
Human aortic endothelial cells (HAECs)	Ang-(1-7)	↓ Monocyte/macrophage adhesion and migration ↓ Reactive oxygen species (ROS)	[41]
Mouse pancreatic acinar cancer (MPC-83)	Ang-(1-7) and A779	↓ TNF- α , IL-6, and IL-8 ↑ Levels of IL-10 ↓ p38 MAPK and NF κ B signaling pathway <i>Blocked Ang-(1-7) effects</i>	[67]
Rat pancreatic acinar AR42J cells	Ang-(1-7)	↓ TLR4/NF- κ B signaling pathway ↓ TNF- α , IL-6, and IL-8 mRNA levels ↓ IL-10 mRNA levels	[64]

Legend: A779 antagonist of Mas receptor, *Ang II* angiotensin II, *Ang (1-7)* Angiotensin 1-7, *AVE0991* nonpeptide agonist of Mas receptor, *MAS* Mas receptor, *MMP-2* matrix metalloproteinase 2, *IL* interleukin, *TNF- α* tumor necrosis factor alpha, *TGF- β* transforming growth factor beta, *ROS* reactive oxygen species, *eNOS* endothelial nitric oxide synthase, *NF κ B* factor nuclear kappa B, *MCP-1* monocyte chemoattractant protein-1, *ICAM-1* intercellular adhesion molecule 1, *VCAM-1* vascular cell adhesion protein 1, *iNOS* inducible nitric oxide synthase, *TLR-4* Toll-like receptor 4, *WKYMV* fMLP-like peptide

suggest that the overarching effects of Ang-(1-7) is to decrease cell functions associated with active pro-inflammatory responses. For example, in neutrophils, Ang-(1-7) reduced survival and induced apoptosis, and reduced recruitment and NF κ B activation [4, 20].

The treatment of Ang-(1-7) or AVE0991 in macrophage attenuated the expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β , CCL2 and CXCL10 pro-inflammatory cytokines, and reduced Src kinase activity [55, 57], M1 polarization, and the number of proliferating T cells [17, 55]. Ang-(1-7) has also shown anti-proliferative effects in human peripheral blood mononuclear cells (HPBMC) [12].

In cultured hypothalamic microglia, treatment with Ang-(1-7) decreased the basal levels of mRNA for the pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α and increased in basal levels the anti-inflammatory cytokine IL-10 [25].

In human lung adenocarcinoma epithelial cells (A549), Ang-(1-7) reduced migration and phosphorylation of PI3K/AKT, JNK1/2, and p38 MAPK signaling pathways [39]. Ang-(1-7) decreases the activation of oxidative stress in epithelial cells [33]. It was also demonstrated in pancreatic cells that the treatment with Ang-(1-7) reduced pro-inflammatory cytokine release, increased IL-10 levels and reduced pro-survival signaling pathways including PI3K/AKT [63], TLR4/NF κ B [65] and p38 MAPK [67].

It was demonstrated that pre-treatment with Ang-(1-7) in human aortic endothelial cells (HAECs) prevented monocyte adhesion and migration impairment induced by thrombin via downregulation of reactive oxygen species (ROS) production [41]. Similar effects were observed in Umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The treatment with Ang-(1-7) reduced cell adhesion molecule expression and NF κ B and p38 activation [24]. Ang-(1-7) could counteract the pro-inflammatory effects of Ang II in skeletal muscle cells [23, 37]. Ang-(1-7) attenuated the induction of iNOS through its binding to Mas receptor [62].

Resolution of Inflammation and Ang-(1-7)

During inflammation, leukocytes interact with the endothelial cells, scanning the tissue for molecular cues for migration, a process called rolling and this is dependent on a group of adhesion molecules named selectins. Once these leukocytes find a chemoattractant molecule to which they bind, integrins on their surface switch into an active conformation state. The activation of integrins allows firm adhesion to endothelial cells and consequent migration into tissues [45]. There is now much interest in understanding not only the mechanisms by which cells migrate into tissues, but also the understanding of the mechanisms responsible for keeping cells there or clearing them from tissue. There is a feeling that novel therapies may be derived from the knowledge of the mechanisms that resolve inflammation. The resolution of acute inflammation is an active process, which is characterized by active biosynthesis pro-resolving mediators that limit the duration of inflammatory response and induce the return to homeostasis [6]. Therefore, different from anti-inflammatory therapy, pro-resolving strategies should balance the inflammatory response to reach homeostasis.

The key steps for the induction of resolution of inflammation include reduction or blockade of neutrophil recruitment to the site of inflammation, induction of

neutrophil apoptosis, increase expression of find-me and eat-me signals, induction of phagocytosis of apoptotic neutrophil by macrophages (efferocytosis), a non-phlogistic recruitment of monocytes, reprogramming of macrophages from classically activated to alternative activated, instructs the adaptive immune system and induction of repair and regeneration [46, 58].

Pro-resolving mediators initiate resolution programs by acting on specific cell surface G-protein-coupled receptor to drive cellular response to restore the homeostasis [46]. Of note, the Mas receptor is a G-protein-coupled receptor [66]. As discussed above, there is much evidence to suggest that Ang-(1-7) and its Mas receptor have potent anti-inflammatory effects. More recently, we have shown that this molecule also has relevant pro-resolving activity. Indeed, Ang-(1-7) induced apoptosis of neutrophils and increased their clearance by macrophage, therefore enhancing efferocytosis. The resolution of neutrophilic inflammation was associated with a decrease of NF κ B phosphorylation [4]. The same was observed for in a model of eosinophilic inflammation. Ang-(1-7) increased the number of apoptotic eosinophil, which was associated with decreased NF κ B, ERK1/2 and GATA3 expression [30]. The treatment with Ang-(1-7) also significantly improved apoptosis of immune cells, and reduced neutrophil chemotaxis and superoxide release in vitro [20].

Altogether, these studies suggest that Ang-(1-7) has a role in the resolution of inflammation by fulfilling some fundamental criteria: limitation of neutrophil recruitment, counter regulation of chemokine and cytokines, induction of apoptosis of neutrophils and their subsequently efferocytosis and reprogramming of macrophages. Molecules that fulfil these criteria are qualified as pro-resolving mediators [58] (Fig. 2).

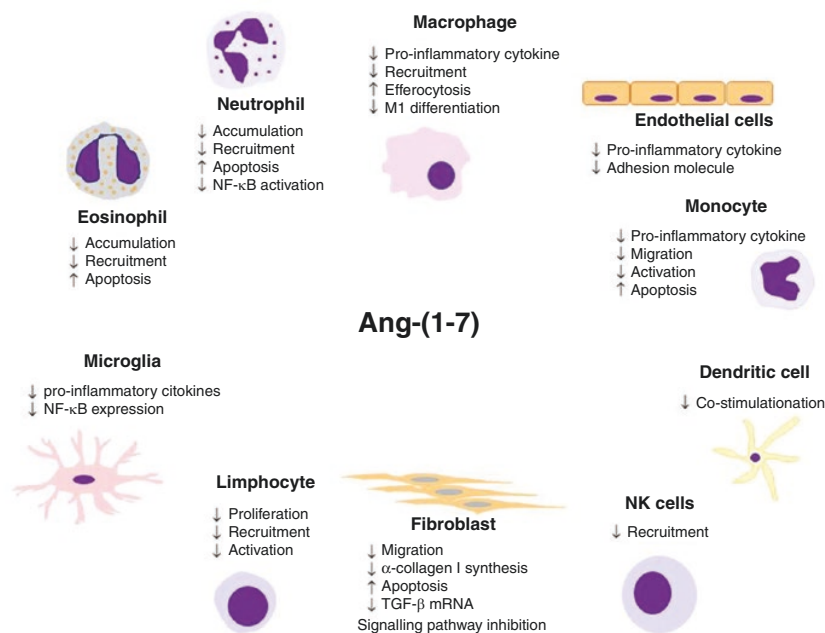


Fig. 2 Ang-(1-7) effects in different type of cells

Concluding Remarks

In the last decade, many insights of renin-angiotensin system (RAS) axis have been revealed. An important advance in the understanding of RAS was the recognition of Ang-(1-7) as a biologically active peptide produced from the cleavage of Ang-II by the angiotensin converting enzyme type 2 (ECA2) and acts through a receptor coupled to the specific G-protein, the Mas receptor. Identification of the Mas and MrgD protein as the Ang-(1-7) receptor provided an important molecular basis for the biological significance of this peptide, although there is no evidence of the downstream signaling.

Ang-(1-7) has been demonstrated to have many beneficial actions in the context of inflammatory response. In most studies, Ang-(1-7) reduced leukocyte recruitment, and the production and expression of chemokines, cytokines and adhesion molecules. Moreover, there was downregulation of signaling pathways, such as PI3K/Akt, p38 MAPK and NFκB, usually associated with an active inflammatory response. In addition to preventing crucial aspects of the productive phase of the inflammatory response, the binding of Ang-(1-7) to Mas receptor increases neutrophil apoptosis, efferocytosis and macrophage reprogramming from classically active to alternatively activated. All these functions appear to contribute to the capacity of this molecule to induce the resolution of inflammation in various animal models of inflammation.

It is unclear and further studies are needed to elucidate the downstream events triggered by Ang-(1-7)/Mas receptor and that modulate inflammation. In addition, further studies are needed to evaluate the role and relevance of Ang-(1-7) in the context of adaptive immunity and T cell function.

Understanding the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor pathway may represent a valuable pharmacological opportunity to reveal new strategies to attenuate the pro-inflammatory environment that promotes and sustains the development of various chronic diseases. Activation of this pathway may not only attenuate pro-inflammatory responses but may also improve the resolution of inflammation and minimize inflammatory tissue damage and disease.

References

1. Abd-Alhaseeb MM, Zaitone SA, Abou-El-Ela SH, Moustafa YM. Olmesartan potentiates the anti-angiogenic effect of sorafenib in mice bearing Ehrlich's ascites carcinoma: role of angiotensin (1-7). *PLoS One*. 2014;9:e85891.
2. Asghar W, Aghazadeh-Habashi A, Jamali F. Cardiovascular effect of inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs on renin-angiotensin system in experimental arthritis. *Inflammopharmacology*. 2017;25:543–53.
3. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50(1):439–65. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105610>.
4. Barroso LC, Magalhaes GS, Galvão I, Reis AC, Souza DG, Sousa LP, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Pinho V, Teixeira MM. Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Front Immunol*. 2017;8:1596. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01596>.

5. Bihl JC, et al. Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NFκB inflammatory pathway. *Vasc Pharmacol.* 2015;73:115–23.
6. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity.* 2014;40(3):315–27. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.009>.
7. Cao G, Della Penna SL, Kouyoumdzian NM, Choi MR, Gorzalczy S, Fernández BE, Toblli JE, Rosón MI. Immunohistochemical expression of intrarenal renin angiotensin system components in response to tempol in rats fed a high salt diet. *World J Nephrol.* 2017;6(1):29–40. <https://doi.org/10.5527/wjn.v6.i1.29>.
8. Castor MGM, Santos RAS, Duarte IDG, Romero TRL. Angiotensin-(1-7) through Mas receptor activation induces peripheral antinociception by interaction with adrenoceptors. *Peptides.* 2015;69:80–5. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.011>.
9. Corrêa Barroso L, Daniela Silveira K, Xavier Lima C, Borges V, Bader M, Rachid M, Augusto Souza Santos R, Gloria Souza D, Cristina Simões Silva A, Martins Teixeira M. Renoprotective effects of AVE0991, a nonpeptide Mas receptor agonist, in experimental acute renal injury. *Int J Hypertension.* Hindawi Publishing Corporation. 2012;8. <https://doi.org/10.1155/2012/808726>.
10. Costa ACO, Becker LK, Moraes ER, Romero TRL, Guzzo L, Santos RAS, Duarte IDG. Angiotensin-(1-7) induces peripheral antinociception through mas receptor activation in an opioid-independent pathway. *Pharmacology.* 2012;89(3–4):137–44. <https://doi.org/10.1159/000336340>.
11. Domenig O, Manzel A, Grobe N, Königshausen E, Kaltenecker CC, Kovarik JJ, Stegbauer J, Gurley SB, van Oyen D, Antlanger M, Bader M, Motta-Santos D, Santos RA, Elased KM, Säemann MD, Linker RA, Poglitsch M. Nephrylin is a mediator of alternative renin-angiotensin-system activation in the murine and human kidney. *Sci Rep.* 2016;6(1):33678. <https://doi.org/10.1038/srep33678>.
12. El-Hashim AZ, Renno WM, Raghupathy R, Abduo HT, Akhtar S, Benter IF. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-κB-dependent pathways. *Br J Pharmacol.* 2012;166(6):1964–76. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01905.x>.
13. Fagundes CT, Amaral FA, Teixeira AL, Souza DG, Teixeira MM. Adapting to environmental stresses: the role of the microbiota in controlling innate immunity and behavioral responses. *Immunol Rev.* 2012;245(1):250–64. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01077.x>.
14. Feltenberger JD, Andrade JMO, Paraíso A, Barros LO, Filho ABM, Sinisterra RDM, Sousa FB, Guimarães ALS, de Paula AMB, Campagnole-Santos MJ, Qureshi M, dos Santos RAS, Santos SHS. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979).* 2013;62(2):324–30. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00919>.
15. Forte BL, Slosky LM, Zhang H, Arnold MR, Staatz WD, Hay M, Largent-Milnes TM, Vanderah TW. Angiotensin-(1-7)/Mas receptor as an antinociceptive agent in cancer-induced bone pain. *Pain.* 2016;157(12):2709–21. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000690>.
16. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(8):551–67. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39>.
17. Hammer A, Yang G, Friedrich J, Kovacs A, Lee D-H, Grave K, Jörg S, Alenina N, Grosch J, Winkler J, Gold R, Bader M, Manzel A, Rump LC, Müller DN, Linker RA, Stegbauer J. Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(49):14109–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612668113>.
18. Jawien J, Toton-Zuranska J, Gajda M, Niepsuj A, Gebaska A, Kus K, Suski M, Pyka-Fosciak G, Nowak B, Guzik TJ, Marcinkiewicz J, Olszanecki R, Korbut R. Angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist ameliorates progress of atherosclerosis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63(1):77–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460464>. Accessed: 23 April 2018.
19. Jiang T, Yu J-T, Zhu X-C, Zhang Q-Q, Tan M-S, Cao L, Wang H-F, Lu J, Gao Q, Zhang Y-D, Tan L. Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain

- angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. *Br J Pharmacol.* 2014;171(18):4222–32. <https://doi.org/10.1111/bph.12770>.
20. Khajjah MA, Fateel MM, Ananthalakshmi KV, Luqmani YA. Anti-inflammatory action of angiotensin 1-7 in experimental colitis may be mediated through modulation of serum cytokines/chemokines and immune cell functions. *Dev Comp Immunol.* 2017;74:200–8. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.005>.
 21. Klein N, Gembarde F, Supé S, Kaestle SM, Nickles H, Erfinanda L, Lei X, Yin J, Wang L, Mertens M, Szaszi K, Walther T, Kuebler WM. Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med.* 2013;41(11):e334–43. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31828a6688>.
 22. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension (Dallas, Tex: 1979).* 2002;40(5):774–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12411476>. Accessed: 21 April 2018.
 23. Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, Morales MA. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res.* Elsevier Ltd. 2015;97:122–30. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.04.012>.
 24. Liang B, Wang X, Zhang N, Yang H, Bai R, Liu M, Bian Y, Xiao C, Yang Z. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 expression via the MAS receptor through suppression of P38 and NF- κ B pathways in HUVECs. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35(6):2472–82. <https://doi.org/10.1159/000374047>.
 25. Liu M, Shi P, Summers C. Direct anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) on microglia. *J Neurochem.* 2016;136(1):163–71. <https://doi.org/10.1111/jnc.13386>.
 26. Lu W, Kang J, Hu K, Tang S, Zhou X, Yu S, Li Y, Xu L. Angiotensin-(1-7) inhibits inflammation and oxidative stress to relieve lung injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2016;49(10):e5431. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165431>.
 27. Lu W, Kang J, Hu K, Tang S, Zhou X, Yu S, Xu L. Angiotensin-(1-7) relieved renal injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats by reducing inflammation, oxidative stress and fibrosis. *Braz J Med Biol Res.* 2017;50(1). <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165594>.
 28. Ma H, Kong J, Wang Y-L, Li J-L, Hei N-H, Cao X-R, Yang J-J, Yan W-J, Liang W-J, Dai H-Y, Dong B. Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by multiple mechanisms in rats. *Oncotarget.* 2017;8(15):24548–63. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15595>.
 29. Magalhães GS, et al. Chronic allergic pulmonary inflammation is aggravated in angiotensin-(1-7) Mas receptor knockout mice. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2016;311:L1141–8.
 30. Magalhaes GS, Barroso LC, Reis AC, Rodrigues-Machado MG, Gregório JF, Motta-Santos D, Oliveira AC, Perez DA, Barcelos LS, Teixeira MM, Santos RAS, Pinho V, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) promotes resolution of eosinophilic inflammation in an experimental model of asthma. *Front Immunol.* 2018;9:58. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00058>.
 31. Magalhães GS, Rodrigues-Machado MG, Motta-Santos D, Silva AR, Caliarí MV, Prata LO, Abreu SC, Rocco PRM, Barcelos LS, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *Br J Pharmacol.* 2015;172(9):2330–42. <https://doi.org/10.1111/bph.13057>.
 32. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010;140(6):771–6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.
 33. Meng Y, Li T, Zhou GS, Chen Y, Yu CH, Pang MX, Li W, Li Y, Zhang WY, Li X. The angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/Mas axis protects against lung fibroblast migration and lung fibrosis by inhibiting the NOX4-derived ROS-mediated RhoA/Rho kinase pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22(3):241–58. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5818>.
 34. Meng Y, Yu CH, Li W, Li T, Luo W, Huang S, Wu PS, Cai SX, Li X. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas axis protects against lung fibrosis by inhibiting the MAPK/NF- κ B pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(4):723–36. <https://doi.org/10.1165/rmb.2012-0451OC>.

35. Miranda AS, Simões e Silva AC. Serum levels of angiotensin converting enzyme as a biomarker of liver fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2017;23(48):8439–42. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i48.8439>.
36. Moore ED, Kooshki M, Metheny-Barlow LJ, Gallagher PE, Robbins ME. Angiotensin-(1-7) prevents radiation-induced inflammation in rat primary astrocytes through regulation of MAP kinase signaling. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1060–8.
37. Morales MG, Abrigo J, Menezes C, Simon F, Cisternas F, Rivera JC, Vazquez Y, Cabello-Verrugio C. The Ang-(1-7)/Mas-1 axis attenuates the expression and signalling of TGF- β 1 induced by AngII in mouse skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)*. 2014;127(4):251–64. <https://doi.org/10.1042/CS20130585>.
38. Mori J, Patel VB, Ramprasath T, Alrob OA, DesAulniers J, Scholey JW, Lopaschuk GD, Oudit GY. Angiotensin 1-7 mediates renoprotection against diabetic nephropathy by reducing oxidative stress, inflammation, and lipotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(8):F812–21. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00655.2013>.
39. Ni L, Feng Y, Wan H, Ma Q, Fan L, Qian Y, Li Q, Xiang Y, Gao B. Angiotensin-(1-7) inhibits the migration and invasion of A549 human lung adenocarcinoma cells through inactivation of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Oncol Rep*. 2012;27(3):783–90. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1554>.
40. Ocaranza MP, Moya J, Barrientos V, Alzamora R, Hevia D, Morales C, Pinto M, Escudero N, García L, Novoa U, Ayala P, Díaz-Araya G, Godoy I, Chiong M, Lavandero S, Jalil JE, Michea L. Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J Hypertens*. 2014;32(4):771–83. <https://doi.org/10.1097/HJH.000000000000094>.
41. Pai W-Y, Lo W-Y, Hsu T, Peng C-T, Wang H-J. Angiotensin-(1-7) inhibits thrombin-induced endothelial phenotypic changes and reactive oxygen species production via NADPH oxidase 5 downregulation. *Front Physiol*. 2017;8:994. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00994>.
42. Papinska AM, Soto M, Meeks CJ, Rodgers KE. Long-term administration of angiotensin (1-7) prevents heart and lung dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes (db/db) by reducing oxidative stress, inflammation and pathological remodeling. *Pharmacol Res*. 2016;107:372–80. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.02.026>.
43. Pena Silva RA, Kung DK, Mitchell IJ, Alenina N, Bader M, Santos RAS, Faraci FM, Heistad DD, Hasan DM. Angiotensin 1-7 reduces mortality and rupture of intracranial aneurysms in mice. *Hypertension*. 2014;64(2):362–8. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03415>.
44. Pereira RM, dos Santos RAS, Teixeira MM, Leite VHR, Costa LP, da Costa Dias FL, Barcelos LS, Collares GB, Simões e Silva AC. The renin–angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of angiotensin-(1-7). *J Hepatol*. 2007;46(4):674–81. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.10.018>.
45. Peres RS, Menezes GB, Teixeira MM, Cunha FQ. Pharmacological opportunities to control inflammatory diseases through inhibition of the leukocyte recruitment. *Pharmacol Res*. 2016;112:37–48. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.015>.
46. Perretti M, Cooper D, Dalli J, Norling LV. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(2):87–99. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.193>.
47. Pinheiro SVB, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, RAS S. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*. 2004;44(4):490–6. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000141438.64887.42>.
48. Rodrigues-Machado MG, Magalhães GS, Cardoso JA, Kangussu LM, Murari A, Caliarí MV, Oliveira ML, Cara DC, Noviello MLM, Marques FD, Pereira JM, Lautner RQ, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. AVE 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma. *Br J Pharmacol*. 2013;170(4):835–46. <https://doi.org/10.1111/bph.12318>.
49. Shenoy V, et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:1065–72.

50. Shimada K, et al. Angiotensin-(1-7) protects against the development of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35:1163–8.
51. Silveira KD, Barroso LC, Vieira AT, Cisalpino D, Lima CX, Bader M, Arantes RME, dos Santos RAS, Simões-e-Silva AC, Teixeira MM. Beneficial effects of the activation of the angiotensin-(1-7) Mas receptor in a murine model of adriamycin-induced nephropathy. *PLoS One.* Edited by J-C Dussault. 2013a;8(6):e66082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066082>.
52. Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Barroso LC, Queiroz-Junior CM, Costa VV, Sousa LFC, Oliveira ML, Bader M, Silva TA, Santos RAS, Silva ACSE, Teixeira MM. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. *Peptides.* 2013b;46:53–63. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.05.012>.
53. da Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Sachs D, Barroso LC, Costa VV, Bretas TLB, Bader M, de Sousa LP, da Silva TA, dos Santos RAS, Simoes e Silva AC, Teixeira MM. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, Mas, in experimental models of arthritis. *J Immunol.* 2010;185(9):5569–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000314>.
54. Simões e Silva A, Silveira K, Ferreira A, Teixeira M. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2013;169(3):477–92. <https://doi.org/10.1111/bph.12159>.
55. Skiba DS, Nosalski R, Mikolajczyk TP, Siedlinski M, Rios FJ, Montezano AC, Jawien J, Olszanecki R, Korbut R, Czesnikiewicz-Guzik M, Touyz RM, Guzik TJ. Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1-7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 2017;174(22):4055–69. <https://doi.org/10.1111/bph.13685>.
56. South AM, Nixon PA, Chappell MC, Diz DI, Russell GB, Snively BM, Shaltout HA, Rose JC, O’Shea TM, Washburn LK. Antenatal corticosteroids and the renin-angiotensin-aldosterone system in adolescents born preterm. *Pediatr Res.* 2017;81(1–1):88–93. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.179>.
57. Souza LL, Costa-Neto CM. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *J Cell Physiol.* 2012;227(5):2117–22. <https://doi.org/10.1002/jcp.22940>.
58. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: what controls its onset? *Front Immunol.* 2016;7:160. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160>.
59. Sukumaran V, Tsuchimochi H, Tatsumi E, Shirai M, Pearson JT. Azilsartan ameliorates diabetic cardiomyopathy in young db/db mice through the modulation of ACE-2/ANG 1–7/Mas receptor cascade. *Biochem Pharmacol.* 2017;144:90–9.
60. Uemura H, Ishiguro H, Kubota Y. Pharmacology and new perspectives of angiotensin II receptor blocker in prostate cancer treatment. *Int J Urol.* 2008;15(1):19–26. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2007.01937.x>.
61. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002;277(17):14838–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200581200>.
62. Villalobos LA, San Hipólito-Luengo Á, Ramos-González M, Cercas E, Vallejo S, Romero A, Romacho T, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. The angiotensin-(1-7)/mas Axis counteracts angiotensin II-dependent and -independent pro-inflammatory Signaling in human vascular smooth muscle cells. *Front Pharmacol.* 2016;7:482. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00482>.
63. Wang J, Liu R, Qi H, Wang Y, Cui L, Wen Y, Li H, Yin C. The ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis protects against pancreatic cell damage in cell culture. *Pancreas.* 2015;44(2):266–72. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000247>.
64. Wang Y, et al. Angiotensin 1-7 ameliorates caerulein-induced inflammation in pancreatic acinar cells by downregulating Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B expression. *Mol Med Rep.* 2018;17:3511–8.
65. Yang L-W, Qin D-Z, James E, McKallip RJ, Wang N-P, Zhang W-W, Zheng R-H, Han Q-H, Zhao Z-Q. CD44 deficiency in mice protects the heart against angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Shock.* 2018;1. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001132>.

66. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. 1986;45(5):711–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3708691>. Accessed: 23 April 2018.
67. Yu X, Cui L, Hou F, Liu X, Wang Y, Wen Y, Chi C, Li C, Liu R, Yin C. Angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-mas axis prevents pancreatic acinar cell inflammatory response via inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase/nuclear factor- κ B pathway. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):409–20. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3252>.
68. Zambelli V, et al. Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Intensive Care Med Exp*. 2015;3(8)
69. Zhang F, Ren X, Zhao M, Zhou B, Han Y. Angiotensin-(1-7) abrogates angiotensin II-induced proliferation, migration and inflammation in VSMCs through inactivation of ROS-mediated PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways. *Sci Rep*. 2016;6:34621.
70. Zhao Y, Qin Y, Liu T, Hao D. Chronic nerve injury-induced Mas receptor expression in dorsal root ganglion neurons alleviates neuropathic pain. *Exp Ther Med*. 2015;10(6):2384–8. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2801>.
71. Zong W, Yang X, Chen X, Huang H, Zheng H, Qin X, Yong Y, Cao K, Huang J, Lu X. Regulation of angiotensin-(1-7) and angiotensin II type 1 receptor by telmisartan and losartan in adriamycin-induced rat heart failure. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(11):1345–50. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.96>.

1.3.2 Lipoxina A4

Os componentes da família de mediadores lipídicos possuem um importante papel na resolução da inflamação e são gerados logo após o contato com o estímulo danoso. Lipoxina A₄ (LXA₄), um dos componentes dessa família, é gerada pela síntese bioquímica do ácido araquidônico por meio da ação das enzimas 5- e 15-lipoxigenase (5-LOX e 15-LOX) (figura 9) e é não somente conhecida pela sua capacidade anti-inflamatória mas também por sua potencial propriedade pró-resolutiva e anti-fibrótica (BANNENBERG; SERHAN, 2010).

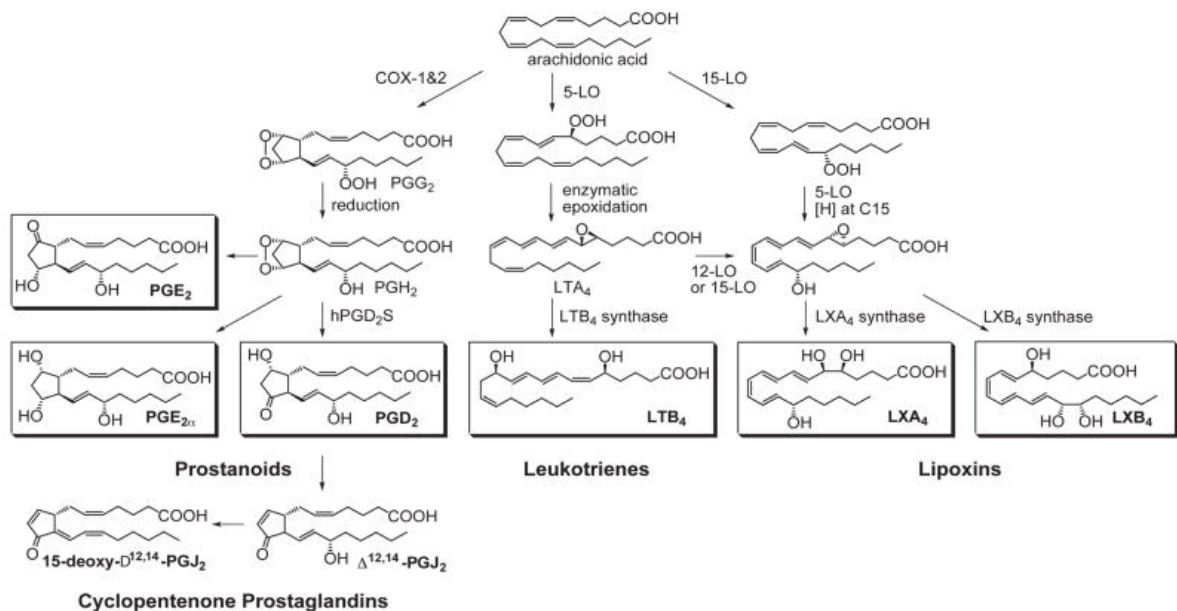


Figura 11 – Vias do metabolismo do ácido araquidônico. Produtos do ácido araquidônico com propriedades pró-inflamatórias (prostanoides e leucotrienos) e anti-inflamatórias e pró-resolutivas (lipoxinas) (SERHAN, CHARLES N; YACOUBIAN; YANG, 2008)

Lipoxina A₄ diminui o recrutamento de neutrófilos e aumenta a ativação do processo de apoptose nessas células (WEINBERGER *et al.*, 2008). Décadas atrás, Serhan *et al.* já haviam demonstrado o papel da LXA₄ na diminuição da adesão e transmigração de neutrófilos humanos (SERHAN, C N *et al.*, 1995). Em camundongos, o efeito anti-inflamatório desse mediador lipídico no recrutamento de neutrófilos também foi demonstrado. Em um modelo de hepatite alcohólica, Queck *et al.* mostraram que o tratamento com LXA₄ diminuiu os números de neutrófilos no fígado dos animais tratados, assim como diminuiu o dano tecidual desses animais (QUECK *et al.*, 2020). Em um outro estudo, o tratamento com LXA₄ diminuiu o dano ocular causado por *Aspergillus fumigatus* associado a diminuição do recrutamento de neutrófilos e de

citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1 β (ZHU *et al.*, 2021). Dai *et al.* também demonstraram a capacidade em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio do tratamento de células estromais do endométrio de pacientes com endometriose com LXA₄. O tratamento gerou a inibição da liberação de IL-1 β e consequente inibição de ciclooxigenase-2 e teve seu efeito perdido por meio do inibidor de seu receptor FPR2/ALX (DAI *et al.*, 2019). A diminuição de citocinas pró-inflamatórias, inclusive IL-1 β , por meio da LXA₄ também pôde ser observada em modelos de aterosclerose induzida por diabetes (BRENNAN *et al.*, 2018). Em um modelo de isquemia e reperfusão renal os efeitos anti-inflamatórios da LXA₄ também foram observados onde houve uma diminuição do recrutamento celular e da liberação de mediadores inflamatórios pela supressão do fator de transcrição NF-kB (LIU, ZHAOHUI *et al.*, 2019) fato igualmente observado em modelo de sepse (WALKER *et al.*, 2011).

Assim como já foi demonstrado a capacidade anti-inflamatória da LXA₄, suas propriedades pró-resolutivas também já foram estudadas. Uma característica importante de todo mediador pró-resolutivo é a sua capacidade de ativar o processo de apoptose em neutrófilos e, ao mesmo tempo, estimular sua eferocitose por meio da reprogramação macrofágica (VAGO *et al.*, 2021). LXA₄ possui a capacidade de diminuir o recrutamento de PMNs além de ativar o processo de apoptose nessas células. Além disso, essa molécula é capaz de induzir a eferocitose desses neutrófilos apoptóticos por macrófagos M2, sendo, esses, processos essenciais para a homeostasia tecidual (CHIANG; SERHAN, 2017; SERHAN, CHARLES N *et al.*, 2014). A reprogramação macrofágica é importante para que haja a eferocitose de células apoptóticas e a LXA₄ é capaz de modificar o fenótipo macrofágico direcionando sua programação para o subtipo M2 (VASCONCELOS *et al.*, 2015). De fato, Hawkins *et al.* demonstraram que o tratamento de animais, que foram submetidos a isquemia cerebral, com um análogo de LXA₄ diminuiu o dano cerebral causado pela oclusão arterial, o que foi relacionado a diminuição de macrófagos M1 e citocinas pró-inflamatórias, assim como ao aumento de macrófagos M2 no cérebro dos animais tratados se comparado ao cérebro dos animais que não receberam o tratamento (HAWKINS *et al.*, 2017).

A LXA₄ possui um papel importante não somente na resposta imune inata, mas também na resposta imune adaptativa. Em um modelo de urticária autoimune experimental, a produção endógena dessa molécula é crucial para limitar o desenvolvimento da doença. Do mesmo modo, o tratamento com esse mediador lipídico limita o desenvolvimento da doença por meio da redução dos números de linfócitos TCD4 e níveis de ciclooxigenase 2 (WEI *et al.*, 2020). LXA₄

está, de fato, relacionada ao aumento de linfócitos T regulatórios e diminuição de linfócitos Th1 e Th17 (GAO *et al.*, 2018). Em relação aos linfócitos B, Ramon *et al.* demonstraram a ação da LXA₄ e do seu receptor, ALX/FPR2 em células B humanas. Eles mostraram que o tratamento de linfócitos B com esse mediador diminuiu a proliferação dessas células e a produção de anticorpos IgM e IgG por meio da ligação dessa molécula com seu receptor. Também em um modelo animal de imunização com ovalbumina o tratamento com LXA₄ diminuiu consideravelmente a quantidade de anticorpos no sangue dos animais tratados (RAMON *et al.*, 2014). O papel do receptor de LXA₄ no controle de produção de anticorpos também foi observado em outros modelos inflamatórios (WANG, CHING-SHUEN; BAKER, 2018)

No contexto pulmonar, LXA₄ possui um papel relevante em modelos de dano pulmonar agudo induzido por LPS. Nesse contexto, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o tratamento com o agonista do receptor de LXA₄ causou uma diminuição na apoptose de macrófagos alveolares, sendo que, além disso, *in vivo*, o tratamento causou a diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (LIU, HUAIZHENG *et al.*, 2018). Em outro modelo de dano pulmonar agudo induzido por malária, o tratamento com LXA₄ gerou uma melhora na função pulmonar, assim como nos parâmetros histopatológicos da doença. O tratamento teve como consequência a diminuição do recrutamento neutrofilico por meio da inibição da quimiocina CXCL1 e devido a inibição do processo migratório dessas células gerada pelo tratamento (PÁDUA *et al.*, 2018). Em um outro modelo de dano pulmonar agudo induzido por sepse o tratamento com LXA₄ aumentou a taxa de sobrevivência dos animais tratados e diminuiu os números de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6. Foi observado que a diminuição dos parâmetros inflamatórios analisados estava relacionada a diminuição da ativação da expressão proteica de p38/MAPK (HU *et al.*, 2020). De fato, a capacidade anti-inflamatória da LXA₄ estava relacionada a diminuição da ativação da via de p38/MAPK em vários outros modelos inflamatórios (DAI *et al.*, 2019b; GUO, YAN-PING *et al.*, 2018; GUO, ZONGDUO *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2019). Em um outro estudo, Lou *et al.* demonstrou que, em um modelo de hiperóxia, o tratamento de células epiteliais pulmonares com LXA₄ não somente diminuiu a ativação de p38/MAPK mas também diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e MCP-1. Além disso, o tratamento aumentou a taxa de sobrevivência e viabilidade das células em estudo, mostrando que a proteção gerada pelo tratamento estava relacionada a diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e inibição da via de p38/MAPK (LUO *et al.*, 2020).

Além de propriedades anti-inflamatórias, já se sabe que LXA₄ e seu receptor também possuem propriedades anti-fibróticas (BÖRGESON *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2019), porém o papel terapêutico da LXA₄ na fibrose pulmonar permanece desconhecido. O que se sabe é que esse mediador lipídico é capaz de inibir a diferenciação de fibroblasto em miofibroblasto causada pela ação de TGF- β , com consequente diminuição da produção e deposição de colágeno (ROACH *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2016). Além disso, LXA₄ é capaz de inibir a produção de caderina (ZHENG *et al.*, 2016) uma molécula de adesão essencial para o contato entre macrófagos e miofibroblastos, o que causará o estabelecimento de um nicho pró-fibrótico por meio da ação de TGF- β (LODYGA; HINZ, 2019). Esses estudos demonstram o efeito preventivo da LXA₄, sendo, portanto, necessário estudos com estratégias terapêuticas para entender o papel desse mediador em momentos mais tardios da fibrose pulmonar.

Visto que a LXA₄ possui propriedades anti-inflamatórias e pró-resolutivas promissoras, essa molécula e seus análogos têm se tornado interessante opção de estudo com o objetivo de buscar novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias.

2 JUSTIFICATIVA

Moléculas pró-resolutivas vem sendo estudadas pelos seus efeitos anti-inflamatórios, pró-apoptóticos e pela sua capacidade de *clearance* celular por ativação do processo de eferocitose macrofágica, auxiliando no retorno tecidual à homeostase (F *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2021c; SEKHERI *et al.*, 2020). Lipoxina A₄ e angiotensina 1-7 são moléculas pró-resolutivas conhecidas por diminuírem recrutamento de células inflamatórias, por induzirem a diminuição da produção de quimiocinas, de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (GALVÃO *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2016; PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015a).

Essas moléculas possuem um grande potencial para se tornarem estratégia terapêutica no tratamento das doenças inflamatórias. Entretanto foi observado que elas podem apresentar efeitos diversos conforme a doença estudada. Melo *et al.*, demonstraram que, em um contexto de doença inflamatória aguda, o uso terapêutico da angiotensina 1-7 diminuiu parâmetros inflamatórios e letalidade. Foi observado, também, o aumento de parâmetros pró-resolutivos nos pulmões e no lavado broncoalveolar de animais tratados e infectados com Influenza e co-infectados com *Streptococcus pneumoniae*, em uma infecção pós Influenza (MELO *et al.*, 2021c). Em contra partida, quando essa mesma molécula foi utilizada também como estratégia terapêutica em um contexto de doença inflamatória crônica, como fibrose pulmonar, tal efeito não foi observado (F *et al.*, 2019). Diante disso, é importante estudar a mesma molécula em diversos contextos.

Um exemplo de doença inflamatória aguda é a Influenza que ainda é uma doença com altos índices de morbidade de mortalidade (PIROTH *et al.*, 2021). Esses índices gerados se dão pelas complicações causadas durante a infecção, sendo as quatro principais: pneumonia por IAV, pneumonia bacteriana secundária, Síndrome Distress Respiratório Agudo (ARDS – *Acute Respiratory Distress Syndrome*) ou Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), e sepse (KALIL; THOMAS, 2019b). Atualmente, a intervenção mais eficiente é a vacinação. Elas são desenvolvidas anualmente pois há uma alta variância associada a eficácia das mesmas devido à incompatibilidade entre os vírus circulantes e as cepas dessas vacinas. Além disso, há uma carência de estudos sobre a imunidade específica pré-existente para Influenza e seu impacto na eficácia da vacinação (JANG; ROSS, 2019; POLAND, 2018; SANO *et al.*, 2017). Outra medida terapêutica nesse contexto é o uso de antiinflamatórios como antagonistas de CCR2 (GURCZYNSKI *et al.*, 2019) e inibidores do sistema complemento (GARCIA *et al.*, 2013).

Por outro lado, a fibrose pulmonar é uma condição clínica multifatorial que acomete uma grande parte da população com doenças inflamatória crônicas tendo como consequência a perda de função desse órgão. Atualmente existe duas drogas anti-fibróticas aprovadas para tratar essa doença, mas, ainda assim, não impactam significativamente na mortalidade gerada (KRISHNA; CHAPMAN; ULLAH, 2021; LIU, YI-MIN; NEPALI; LIOU, 2017). Em vista disso, é importante estudar alternativas terapêuticas para prevenir ou minimizar os danos de tecidos ou órgão afetados.

Portanto, sabendo que uma mesma molécula pró-resolutiva pode apresentar efeitos diversos em modelos de doenças inflamatórias agudas e crônicas, esse estudo teve como objetivo analisar o efeito da angiotensina 1-7 e da lipoxina A₄ em um contexto de infecção por Influenza e de fibrose pulmonar.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Usar moléculas pró-resolutivas como medida terapêutica para tratar fibrose pulmonar e infecção por Influenza.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito do pré-tratamento e terapêutico da Angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos avaliando:
 - O recrutamento celular;
 - Os níveis de citocinas no BAL dos animais em estudo;
 - A função pulmonar;
 - O dano pulmonar por meio de análises histológicas.
- Estudar o papel da lipoxina A₄ e o efeito terapêutico do seu análogo (benzo-Lipoxina A₄) na infecção por Influenza A em camundongos avaliando:
 - A importância do receptor de lipoxina A₄ (FPR2) na infecção por Influenza no:
 - Recrutamento celular de animais WT e FPR2^{-/-} infectados com Influenza;
 - Nível de citocinas no BAL dos animais em estudos;
 - Dano pulmonar por meio de análises histológicas.
 - A letalidade e perda de peso;
 - O recrutamento celular;
 - O número de células apoptóticas e na eferocitose dessas células;
 - A polarização de macrófagos pela expressão de iNOS, arginase e CD206, assim como na quantidade de linfócitos;
 - O dano pulmonar por meio de análises histológicas.

4 MÉTODOS E RESULTADOS

4.1 Capítulo 1 - Fibrose pulmonar e Angiotensina 1-7

Effect of preventive or therapeutic treatment with angiotensin 1–7 in a model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice.

Flávia Rago, Eliza Mathias Melo, Lucas Kraemer, Izabela Galvão, Geovanni D. Cassali, Robson A. S. Santos, Remo C. Russo, Mauro Martins Teixeira.

PUBLICADO: Journal of Leukocyte Biology, 22 de Fevereiro de 2019.

Nesse trabalho avaliamos o efeito do tratamento preventivo e terapêutico da angiotensina 1-7 em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos.

O tratamento preventivo com Ang-(1-7), iniciado uma hora antes da indução da fibrose pulmonar pela instilação dos animais com bleomicina, gerou um aumento da sobrevivência e uma diminuição do recrutamento celular para o BAL dos animais tratados, assim como a deposição de colágeno no pulmão desses animais se comparado aos animais não tratados. Além disso, o tratamento prévio com essa molécula causou um aumento do número de células apoptóticas e melhorou a função pulmonar dos animais tratados.


Resolvemos, então, avaliar o efeito terapêutico dessa molécula iniciando o tratamento no 3º dia após a indução da fibrose. O tratamento iniciado nesse momento não aumentou a sobrevivência dos animais tratados, porém, diminuiu o recrutamento celular e a deposição de colágeno. Quando avaliamos a função pulmonar dos animais em estudo, constatamos que o tratamento teve efeito em somente um dos parâmetros avaliados (FEV100 – *Forced expiratory volume*). Decidimos atrasar ainda mais o começo do tratamento e em um outro experimento, começamos a tratar os animais no 7º dia após a indução da fibrose. Nesse novo experimento observamos que o tratamento teve seu efeito completamente perdido e o grupo de animais tratados não apresentou parâmetros diferentes quando comparado ao grupo dos animais não tratados.

Portanto, apesar da Ang-(1-7) apresentar prevenir o desenvolvimento da fibrose pulmonar quando usado como pré-tratamento na fibrose pulmonar induzida por bleomicina, mostramos que seu efeito benéfico nesse modelo é dependente do momento em que o tratamento é iniciado, sendo seu efeito prejudicado quando iniciamos o tratamento poucos dias após a indução da fibrose. Assim, nossos resultados mostraram que Ang-(1-7) pode não ser

eficiente se usada para tratar pacientes com fibrose pulmonar. Veja abaixo o artigo em sua íntegra.

ARTICLE

Effect of preventive or therapeutic treatment with angiotensin 1–7 in a model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice

Flávia Rago¹ | Eliza Mathias Melo¹ | Lucas Kraemer² | Izabela Galvão¹ |
 Geovanni D. Cassali³ | Robson A. S. Santos⁴ | Remo C. Russo²  |
 Mauro Martins Teixeira^{1,5}

¹Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Departamento de Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁴Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁵Centro de Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Mauro Martins Teixeira, Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Brazil.
 Email: mmtex@icb.ufmg.br

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis is characterized by aberrant fibroblast activation and excessive collagen deposition that may eventually lead to organ dysfunction. Lung fibrosis is frequently observed in cancer patients undergoing bleomycin (BLM) treatment. Therefore, BLM instillation in mice is the most frequent model used to investigate pulmonary fibrosis. Angiotensin 1–7 [Ang-(1-7)] is a heptapeptide with anti-inflammatory and proresolving activity. Here, we studied the effects of preventive and therapeutic oral administration of Ang-(1-7) in a model of BLM-induced lung fibrosis in mice. Male C57Bl/6j mice were instilled with BLM and followed for weight loss and survival or euthanized to examine pulmonary inflammation, fibrosis, and lung function. For preventive treatment, mice were treated with Ang-(1-7) 1 h before instillation and then twice daily. We observed that preventive treatment with Ang-(1-7) decreased weight loss, inflammation and collagen deposition, increased survival, and ameliorated lung function. Therapeutic treatment with Ang-(1-7), starting 3 days after BLM instillation resulted in decreased inflammation, decreased collagen deposition, and ameliorated lung function, although the effects were of lower magnitude than the preventive treatment. Therapeutic treatment with Ang-(1-7) starting 7 or 14 days after BLM instillation failed to alter any of the changes observed. Therefore, although oral preventive treatment with Ang-(1-7) is effective to decrease pulmonary inflammation, fibrosis, and functional changes induced by BLM, therapeutic effects are much less significant, arguing against its use in patients with chronic fibrosis. It remains to be determined whether other proresolving molecules will have better therapeutic effects in the context of chronic pulmonary fibrosis.

KEYWORDS

bleomycin, inflammation, resolution, lung fibrosis, angiotensin 1–7

1 | INTRODUCTION

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an aggressive and progressive disease responsible for the decrease of lung function caused by excessive activation of myofibroblasts and consequently irreversible collagen deposition. Fibrotic lung diseases, including IPF, represent

a group of fatal lung diseases without treatment, once the etiology of IPF remains unknown. IPF is characterized by activation of fibroblasts and their differentiation to myofibroblasts, leukocyte accumulation in the lungs, chronic production of proinflammatory and profibrotic mediators that lead to the intense tissue remodeling. Of importance, myofibroblast differentiation is responsible for collagen production and deposition in the lung tissue causing a restrictive disease that compromises lung function.^{1,2} To date, there are few studies showing promising strategies to treat pulmonary fibrosis.^{3–8}

Bleomycin (BLM) instillation is the most frequently used animal model of lung fibrosis in mice.⁹ In this model, it has been shown that

Abbreviations: ACE 2, angiotensin 1 converting enzyme 2; Ang-(1-7), angiotensin 1–7; BLM, bleomycin; C_{dyn}, dynamic compliance; FEV₁₀₀, forced expiratory volume at 100 milliseconds; IC, inspiratory capacity; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; RL, resistance; TLC, total lung capacity.

Received: 22 February 2019 | Revised: 19 June 2019 | Accepted: 19 June 2019

J Leukoc Biol. 2019;1–10.

www.jleukbio.org

©2019 Society for Leukocyte Biology | 1

levels of angiotensin II are increased after BLM instillation and there is downregulation of the expression of angiotensin 1 converting enzyme 2 (ACE2) and consequent decrease in angiotensin 1–7 [Ang-(1-7)] production. This is associated with increased collagen deposition in the lungs.¹⁰ Other studies have also shown the association of the activation of ACE2/ang-(1-7) axis and protection against BLM-induced lung fibrosis.^{4,10–12} Chronic infusions of Ang-(1-7) resulted in decreased collagen deposition in the lungs and it was associated with increased expression of ACE2.⁴ Other study showed that lungs of patients with IPF presented significantly decreased ACE2 activity and in a murine model of BLM induced-lung fibrosis, when animals received subcutaneous administration of a recombinant human ACE2 there was a decrease on collagen accumulation.¹⁰ Here, we have evaluated the effects of the oral administration of a formulation containing Ang-(1-7) when given in preventive or therapeutic schedules in a model of BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. We also examined whether Ang-(1-7) would affect the lung dysfunction associated with BLM-induced fibrosis.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Mice

Male C57BL/6J mice (8–10 weeks old), weighting 18–25g, were obtained from the Central Animal Facility from Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/Brazil) and were maintained with free access to commercial chow and water in a 12-h dark–light cycle in the thermoneutral zone for mice. All procedures described had prior approval of the local animal ethics committee (CETEA/UFMG 54/2016).

2.2 | Model of BLM-induced pulmonary fibrosis in mice

The model of BLM-induced pulmonary fibrosis was performed, as previously described.¹³ Briefly, mice were anesthetized subcutaneously with 80 mL of a ketamine and xylazine solution (3.2 mg/kg and 0.16 mg/kg, respectively). Then, a single 40- μ L injection containing 3 mg/kg of BLM (Blenoxane; Bristol-Meyers) diluted in saline, or saline only (control group), was administered by intranasal instillation. In each time-point after BLM or saline instillation, mice were anesthetized with ketamine and xylazine to perform lung function analysis, and then euthanized to collect BAL and lung samples for biochemical and histological analysis.

2.3 | Treatment protocol

Inclusion of Ang-(1-7) into an oligosaccharide HP β CD cavity protects the peptide during its passage through the gastrointestinal tract.¹⁴ Therefore, in this study Ang-(1-7)/HP β CD inclusion compound was used to perform oral administration of Ang-(1-7). Ang-(1-7)/HP β CD inclusion compound (60 μ g/Kg of Ang-(1-7) and 92 μ g/Kg of HP β CD in 200 μ L distilled water; via gavage) or the empty HP β CD (vehicle,

92 μ g/Kg of HP β CD in 200 μ L distilled water) were given by the oral route starting 1 h before, for preventive treatment, or 3, 7, or 14 days after the induction of fibrosis by BLM instillation, for therapeutic treatment. Thereafter, the compound or vehicle was given twice a day until the day when animals were euthanized. The animals were divided into three groups: control (saline only), vehicle (mice treated with HP β CD only) and Ang-(1-7) [mice treated with Ang-(1-7) compound – Ang-(1-7)/HP β CD]. Previous experiments have shown that Ang-(1-7) did not affect baseline parameters in the lung.¹⁵ The dose of Ang-(1-7) chosen was shown to cause significant decrease in various parameters in other models of inflammation.^{16,17} The weight of animals was evaluated on every 3 days and any death daily. For the experiments of preventive treatment, animals were euthanized on day 3, 7, 14, and 21 after BLM instillation and for experiments using a therapeutic schedule, animals were euthanized on day 21 after BLM instillation, as indicated in each experiment. In each time points, pulmonary inflammation, fibrosis, and function were analyzed.

2.4 | Assessment of respiratory function

Respiratory function was measured by invasive spirometry under anesthesia. Briefly, mice were tracheostomized, placed in a body plethysmograph and connected to a computer-controlled ventilator (Forced Pulmonary Maneuver System; Buxco Research Systems, Wilmington, NC), as previously described.^{18,19} Under mechanical respiration, the dynamic compliance (C_{dyn}) and lung resistance (RI) were determined by RI and compliance test. The total lung capacity (TLC) was calculated by FRC + IC. Fast-flow volume maneuver was performed, and lungs were first inflated to +30-cm H₂O and immediately afterward connected to a highly negative pressure to enforce expiration until –30 cm H₂O. The forced expiratory volume at 100 ms was recorded during this maneuver. Suboptimal maneuvers were rejected and for each test in every single mouse, and at least three acceptable maneuvers were conducted to obtain a reliable mean for all numeric parameters.¹⁸

2.5 | BAL and tissue removal

After the evaluation of respiratory function, BAL was performed, and tissues were taken for further analysis. For the BAL, two aliquots of 1 mL of PBS were flushed three times into the lungs to collect leukocytes of the airways of mice, as previously described.²⁰ Briefly, BAL samples (2 mL each) were centrifuged at 600 \times g for 10 min at 4°C. The total number of leukocytes was determined by counting leukocytes in a modified Neubauer chamber. Differential counts were obtained from cytospin (Shandon III) preparations by evaluating the percentage of each leukocyte on a slide stained with May–Grunwald–Giemsa, based on morphological criteria. Each slide was counted three times and the percentage was used to calculate the absolute number of each leukocyte type. The right lung of mice was collected for indirect quantification of mononuclear cells recruitment into the tissue (NAG–*n*-acetilglucosaminidase). The left lobe of the lungs was fixed in formalin for further histological analysis.²¹

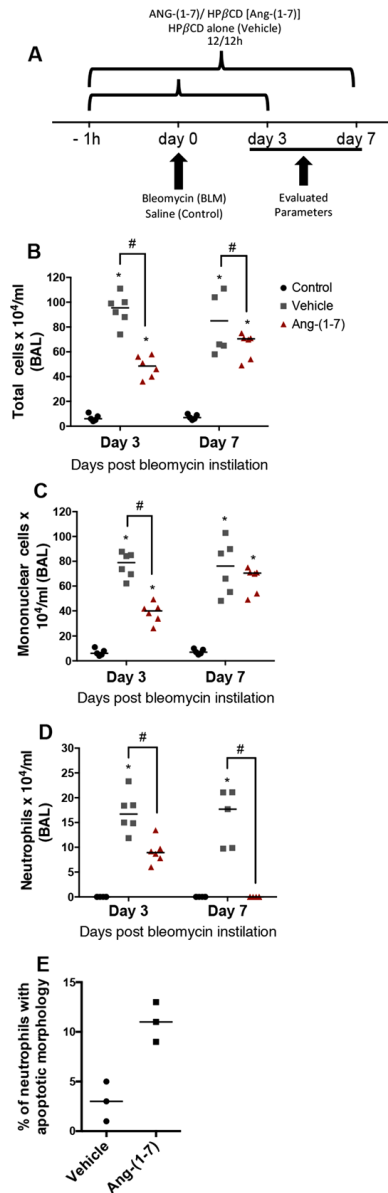


FIGURE 1 Proresolving effect of previous treatment with Ang-(1-7) on inflammation in lungs of animals instilled with bleomycin. Lung fibrosis was induced by a single bleomycin instillation (3 mg/kg) on day 0. Control animals received an instillation of saline alone (black circles). Ang-(1-7) [Ang-(1-7) + vehicle-92 μg/kg] (red triangles) and HPβCD (Vehicle-92 μg/kg) alone (gray squares) were given orally twice (continued on the next column)

2.6 | Histological analyses

After the reperfusion of the lungs, the left lung was collected and fixed in 4% neutral phosphate-buffered formalin (pH 7.4), as described previously.²² The tissues were dehydrated gradually in ethanol, embedded in paraffin, cut into 4 μm sections, stained with Gomori's trichrome, and analyzed under light microscopy by a pathologist blinded to the treatments.

For qualitative score of areas stained with Gomori's trichrome, images of lung sections were captured with a digital camera (Optronics DEI-470) connected to a microscope (Olympus IX70) with a magnification of 200x. Collagen (green areas) deposition was analyzed as previously described.¹³ At least 20 images, covering the entire lung slide area, were obtained for each sample. Results were expressed as the mean score. This morphometrical index was used to describe lung collagen deposition.

2.7 | Statistical analyses

Statistical Analysis Statistics were done using GraphPad Prism 4.0. One-way ANOVA, followed by Bonferroni post-hoc test was used to compare more than two groups and unpaired t-test was used for comparisons between two groups in normally distributed data. The survival curves were analyzed by Long-rank test and the weight loss curves were compared using analyses of area under the curve. Results with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Effects of the preventive treatment with Ang-(1-7) in a model of BLM-induced lung fibrosis

The instillation of BLM increases inflammation, which leads to the activation of fibroblasts and collagen deposition. We evaluated whether Ang-(1-7) would prevent cell recruitment and fibrosis. For that, animals were divided in three groups: (i) control group (instilled with saline—NaCl 0.9% and treated with water); (ii) vehicle (animals given BLM and treated with HPβCD 92 μg/kg); (iii) Ang-(1-7) (animals given BLM and treated with HPβCD 92 μg/kg + Ang-(1-7) 60 μg/kg). The treatment started 1 h before the instillation of BLM and was continued for every 12 h (Fig. 1A and 2A). Airway inflammation was evaluated at days 3 and 7 after BLM instillation and fibrosis at days 14 or 21 after instillation.

a day starting 1 h before bleomycin instillation. Treatment scheme is shown in (A). Number of total cells (B), mononuclear cells (C), and neutrophils (D) in bronchoalveolar lavage fluid was counted on days 3 and 7 after bleomycin instillation. Apoptotic cells were observed and counted on day 3 after the induction of fibrosis (E). Individual and median values are shown. $n = 6$ for vehicle group and 5 for Ang-(1-7), except for (E). Results represent * for $P < 0.05$ when compared to the control group and # for $P < 0.05$ when compared to the vehicle-treated group and in (B), (C), and (D) are from one experiment representative of two experiment

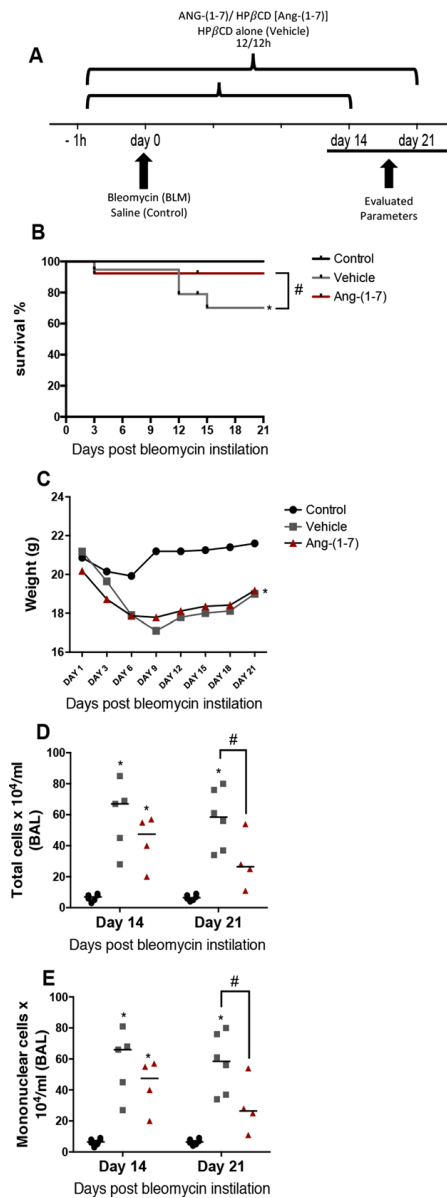


FIGURE 2 Effects of previous treatment with Ang-(1-7) on the survival, weight lost, and number of mononuclear cells in lungs of animals instilled with bleomycin. Lung fibrosis was induced by a single bleomycin instillation (3 mg/kg) on day 0. Control animals received an instillation of saline alone (black circles). Ang-(1-7) [Ang-(1-7)+Vehicle-92 μg/kg] (red triangles) and HPβCD (Vehicle-92 μg/kg) alone (continued on the next column)

Treatment with Ang-(1-7) led to reduction of the number of total leukocytes recovered from BAL (Fig. 1B). There was reduction in number of mononuclear cells on day 3 (Fig. 1C) and on day 21 (Fig. 2D-E) after BLM instillation and in number of neutrophils on day 3 and 7 after the instillation (Fig. 1D). Reduction of leukocyte recruitment was associated with increased percentage of neutrophils with apoptotic morphology, showing a potential proresolving activity of early treatment with Ang-(1-7) (Fig. 1E). Overall, the preventive treatment with Ang-(1-7) failed to affect weight loss significantly (Fig. 2C) but significantly increased survival rate (Fig. 2B).

BLM instillation caused chronic and restrictive respiratory dysfunction, and these effects were associated to loss of elasticity, as detected by decreased lung compliance and increased lung RI (Fig. 3). Preventive treatment with Ang-(1-7) improved lung function, as demonstrated by the parameters of lung respiratory resistance (RI), forced expiratory volume at 100 ms (FEV100) and compliance (Cdyn) at day 21 after BLM instillation (Fig. 3A-D) but not at day 14 after the induction of fibrosis (Supplemental Information).

Amelioration of lung function was associated with decreased collagen deposition on days 14 and 21 after BLM instillation, as shown and quantified by histology (Fig. 4). BLM induced a progressive collagen accumulation as depicted by Gomori's Thricrome staining in vehicles at days 14 (Fig. 4A) and 21 after instillation (Fig. 4B) when compared to control group (Fig. 4E). This was characterized by dense and diffuse interstitial lung fibrosis. Indeed, the treatment with Ang-(1-7) reduced collagen accumulation at days 14 (Fig. 4C) and 21 after BLM instillation (Fig. 4D). In the latter animals, there was focal and less intense interstitial lung fibrosis when compared to vehicles-treated mice. Morphometric analysis showed that the fibrosis score in Ang-(1-7)-treated mice was lower than in vehicle-treated mice (Fig. 4F). Treatment with Ang-(1-7) did not alter the baseline parameters of mice instilled with saline alone (Fig. 4F).

3.2 | Effects of the therapeutic treatment with Ang-(1-7) starting at day 3 after BLM instillation

As the preventive treatment with Ang-(1-7) demonstrated an anti-inflammatory and antifibrotic effect, we wondered whether Ang-(1-7) would decrease BLM-induced lung inflammation and fibrosis when given therapeutically after BLM instillation. To investigate this, we started to treat animals 3 days after BLM instillation. As seen in Fig. 5,

(gray squares) were given orally twice a day starting 1 h before bleomycin instillation. Treatment scheme is shown in (A). Survival was monitored daily (B) and weight lost (C) was monitored every 3 days after bleomycin instillation. Number of total cells (D) and mononuclear cells (E) in bronchoalveolar lavage fluid was counted on days 14 and 21 after bleomycin instillation. In (C), median values are shown. In (D) and (E), individual and median values are shown. There were six animals per group. In (D) and (E) $n = 6$ for control group, 5 for vehicle on day 14 and 6 on day 21 and 4 for Ang-(1-7). Results represent * for $P < 0.05$ when compared to the control group and # for $P < 0.05$ when compared to the vehicle-treated group and are from one experiment representative of two experiment

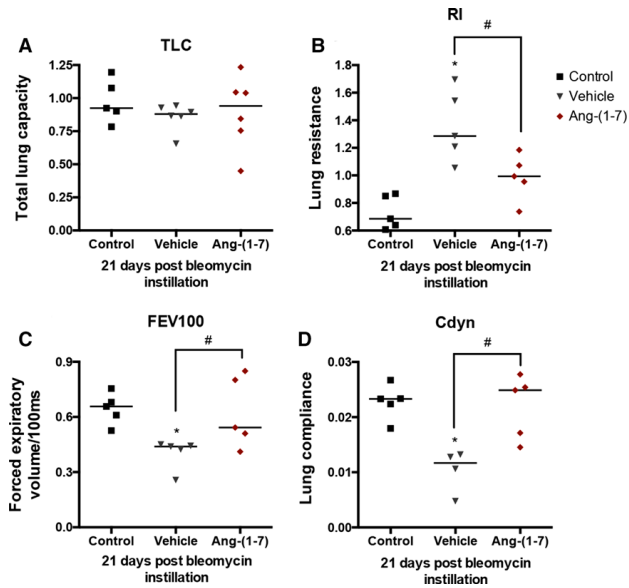


FIGURE 3 Effects of previous treatment with Ang-(1-7) on lung function in animals instilled with bleomycin. Lung fibrosis was induced by a single bleomycin instillation (3 mg/kg) on day 0. Control animals received an instillation of saline alone (black squares). Ang-(1-7) [Ang-(1-7) + Vehicle-92 $\mu\text{g}/\text{kg}$] (red diamonds) and HP β CD (Vehicle-92 $\mu\text{g}/\text{kg}$) alone (gray triangles) were given orally twice a day starting 1 h before bleomycin instillation. Treatment scheme is shown in Fig. 2A. After 14 (Supplemental Information) and 21 days lung function was performed. Analyses of total lung capacity (TLC) (A) ($n = 5$ for control group and 6 for vehicle and Ang-(1-7)), Resistance (RI) (B) ($n = 5$), forced expiratory volume in 100 milliseconds (C) (FEV100) ($n = 5$), dynamic complacency (D) (Cdyn) ($n = 5$). Results represent * for $P < 0.05$ when compared to the control group and # for $P < 0.05$ when compared to the vehicle-treated group and are from one experiment representative of two experiment

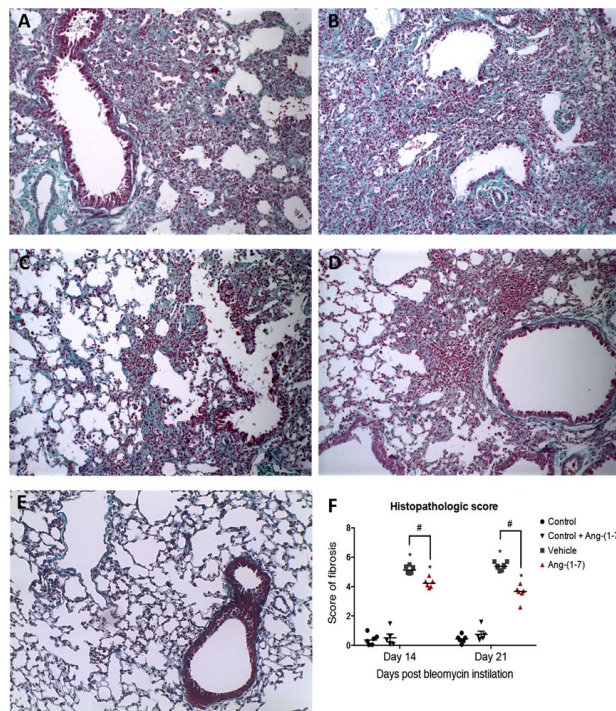


FIGURE 4 Effects of previous treatment with Ang-(1-7) on pulmonary fibrosis in animals instilled with bleomycin. Lung fibrosis was induced by a single bleomycin instillation (3 mg/kg) on day 0. Control animals received an instillation of saline alone (black circles). Ang-(1-7) [Ang-(1-7) + Vehicle-92 $\mu\text{g}/\text{kg}$] (red triangles) and HP β CD (Vehicle-92 $\mu\text{g}/\text{kg}$) alone (gray squares) were given orally twice a day starting 1 h before bleomycin instillation. Treatment scheme is shown in Fig. 2A. After 14 and 21 days, the animals were euthanized. Histopathological changes in lung fibrosis was observed by green areas, scored (F) as described in Methods, for control group (Saline) (E), vehicle group of day 14 (A) and day 21 (B), and for treated mice [Ang-(1-7)] of day 14 (C) and day 21 (D). Results represent * for $P < 0.05$ when compared to the control group and # for $P < 0.05$ when compared to the vehicle-treated group and are from one experiment representative of two experiment

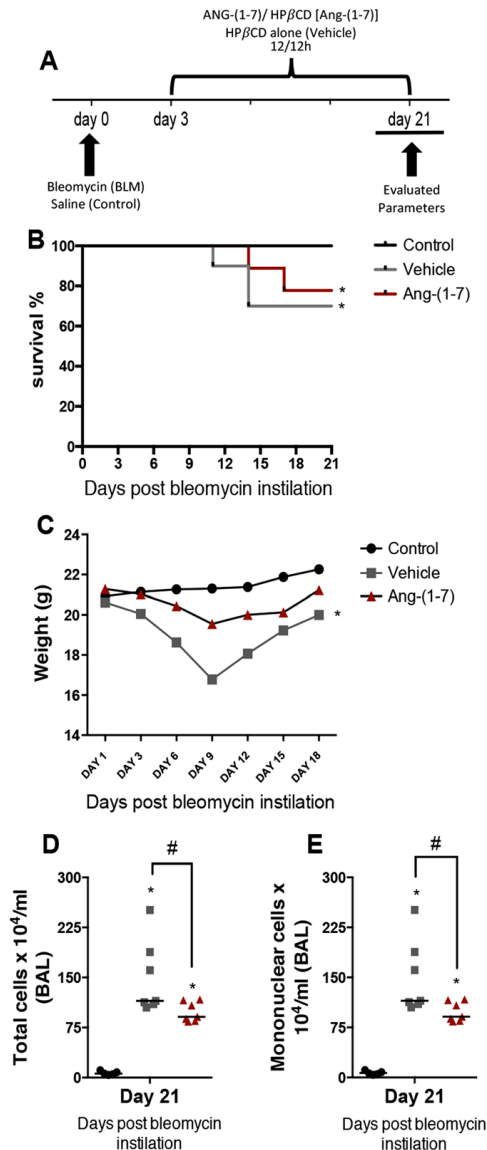


FIGURE 5 Effects of the delayed treatment (3 days) with Ang-(1-7) on survival, weight lost, and levels of mononuclear cells in lungs of animals instilled with bleomycin. Lung fibrosis was induced by a single bleomycin instillation (3 mg/kg) on day 0. Control animals received an instillation of saline alone (black circles). Ang-(1-7) [Ang-(1-7) + Vehicle-92 μg/kg] (red triangles) and HPβCD (Vehicle-92 μg/kg) alone (gray squares) were given orally twice a day starting 3 days after bleomycin instillation. Treatment scheme is shown in (A). Survival was (continued on the next column)

animals treated with Ang-(1-7) presented similar survival and weight loss when compared to the vehicle-treated group (Fig. 5B and C). Nevertheless, treatment was still capable of inducing a decrease in the number of mononuclear cells found in BAL fluid (Fig. 5D and E). This was confirmed in the histopathological analysis, which showed that treatment with Ang-(1-7) starting at day 3 after BLM instillation was associated with reduced collagen accumulation and a focal and less intense interstitial lung fibrosis (Fig. 6B) when compared to vehicles-treated mice (Fig. 6A). These results were also reflected in the fibrosis score (Fig. 6D). However, the therapeutic treatment starting on day 3 after induction of fibrosis did not alter the pulmonary dysfunction associated with BLM instillation (Fig. 7A-D). This was similar to the lack of effect of Ang-(1-7) on the lethality rate (Fig. 5B).

3.3 | Effects of the therapeutic treatment with Ang-(1-7) starting at day 7 after BLM instillation

Next, we evaluated whether the start of the treatment with Ang-(1-7) when fibrosis had already been established (i.e., days 7 or 14) would reverse collagen deposition or decrease lung inflammation and dysfunction. The animals were treated from day 7 to day 21 or from day 14 to day 28 after BLM instillation. In the last experiment, we followed till day 28, so that animals could be treated for a full 2 weeks. As expected, animals instilled with BLM had pulmonary inflammation, mononuclear cell recruitment, fibrosis and lung dysfunction, as seen by decreased lung complacence (Fig. 8). Nevertheless, mice treated from days 7 to 21 (Fig. 8) or from days 14 to 28 (data not shown) after BLM instillation had no improvement on lung function, lung inflammation, or collagen deposition.

4 | DISCUSSION

Ang-(1-7) has been shown to have anti-inflammatory and proresolutive effects in murine models of arthritis and asthma.^{16,17} Due to this, we wondered if the oral treatment with Ang-(1-7) would decrease inflammation and collagen deposition in a model of pulmonary fibrosis induced by BLM. Our results can be summarized as follows: (i) preventive oral treatment with Ang-(1-7) was associated with decreased numbers of neutrophils and mononuclear cells in the lungs and increased numbers of apoptotic cells. (ii) Preventive administration of Ang-(1-7) was also associated with reduced weight loss, reduced collagen deposition, improved lung function, and greater survival. (iii) Therapeutic effects of Ang-(1-7) were observed when treatment was started at

monitored daily (B) and weight lost (C) were monitored every 3 days after bleomycin instillation. Number of mononuclear cells (D) and total cells (E) in bronchoalveolar lavage fluid was counted on day 21 after bleomycin instillation. In (C), median values are shown. In (D) and in (E), individual and median values are shown. There were seven animals per group. Results represent * for $P < 0.05$ when compared to the control group and # for $P < 0.05$ when compared to the vehicle-treated group and are from one experiment representative of two experiment

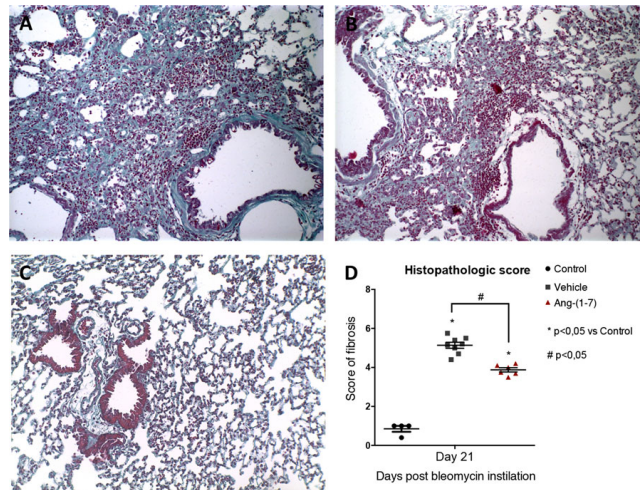


FIGURE 6 Therapeutic effects of Ang-(1-7) on pulmonary fibrosis in lungs of animals instilled with bleomycin. Lung fibrosis was induced by a single bleomycin instillation (3 mg/kg) on day 0. Control animals received an instillation of saline alone (black circles). Ang-(1-7) [Ang-(1-7)+ Vehicle-92 μ g/kg] (red triangles) and HP β CD (Vehicle-92 μ g/kg) alone (gray squares) were given orally twice a day starting 3 days after bleomycin instillation. Treatment scheme is shown in Fig. 5A. After 21 days the animals were euthanized. Histopathological changes in lung fibrosis were observed as green areas, scored (D) as described in Methods, in control group (Saline) (C), vehicle group (A), and in treated mice [Ang-(1-7)] (B). Results represent * for $P < 0.05$ when compared to the control group and # for $P < 0.05$ when compared to the vehicle-treated group and are from one experiment representative of two experiment

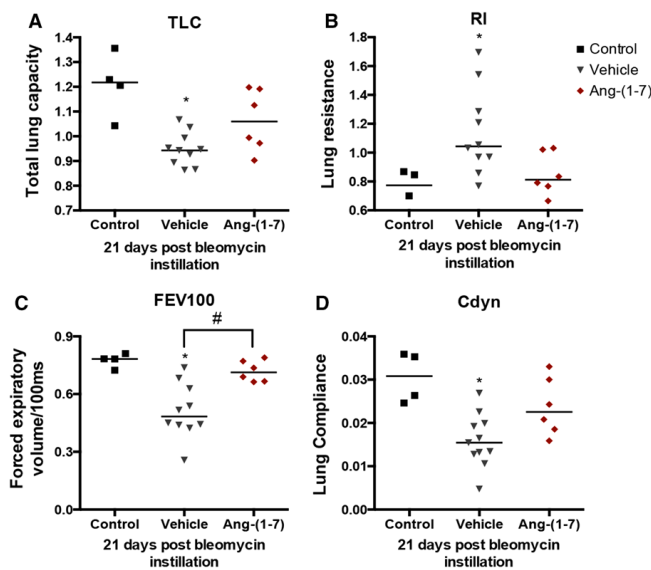


FIGURE 7 Effects of the delayed treatment (3 days) with Ang-(1-7) on lung function in animals instilled with bleomycin. Lung fibrosis was induced by a single bleomycin instillation (3 mg/kg) on day 0. Control animals received an instillation of saline alone (black squares), Ang-(1-7) [Ang-(1-7)+ Vehicle-92 μ g/kg] (red diamonds) and HP β CD (Vehicle-92 μ g/kg) alone (gray triangles) were given orally twice a day starting 3 days after bleomycin instillation. Treatment scheme is shown in Fig. 5A. After 21 days lung function was performed. Analyses of total lung capacity (TLC) (A), resistance (RI) (B), forced expiratory volume in 100 milliseconds (FEV100) (C), dynamic complacency (Cdyn) (D) [$n = 4$ for control group, 5 for vehicle, and 6 for Ang-(1-7)]. Results represent * for $P < 0.05$ when compared to the control group and # for $P < 0.05$ when compared to the vehicle-treated group and are from one experiment representative of two experiment

day 3 after BLM instillation but it was of lower magnitude. Therapeutic effects were completely lost when the compound was given from days 7 or 14 after BLM instillation.

Neutrophils are thought to play an important role in the activation of fibrogenesis.²³ Here, we showed that the preventive treatment with Ang-(1-7) caused reduction in the number of neutrophils and mononuclear cells in the lungs of mice given BLM. The ability of Ang-(1-7) to prevent neutrophil influx could be due to a direct effect on neutrophil migration *in vivo*²⁴ or the ability of this compound to induce neutrophil

apoptosis and resolution.¹⁶ The exact mechanism by which Ang-(1-7) causes inhibition of neutrophil migration was not investigated here, but there was a clear reduction in neutrophil numbers and an increase in number of apoptotic cells in animals given preventive Ang-(1-7) treatment. There was also reduction in number of mononuclear cells in BAL and lung tissue and mononuclear cells, especially macrophages, are known to have central role in the migration and activation of fibroblasts to produce collagen in the context of pulmonary fibrosis.²⁵ The decrease in leukocyte accumulation caused by preventive treatment

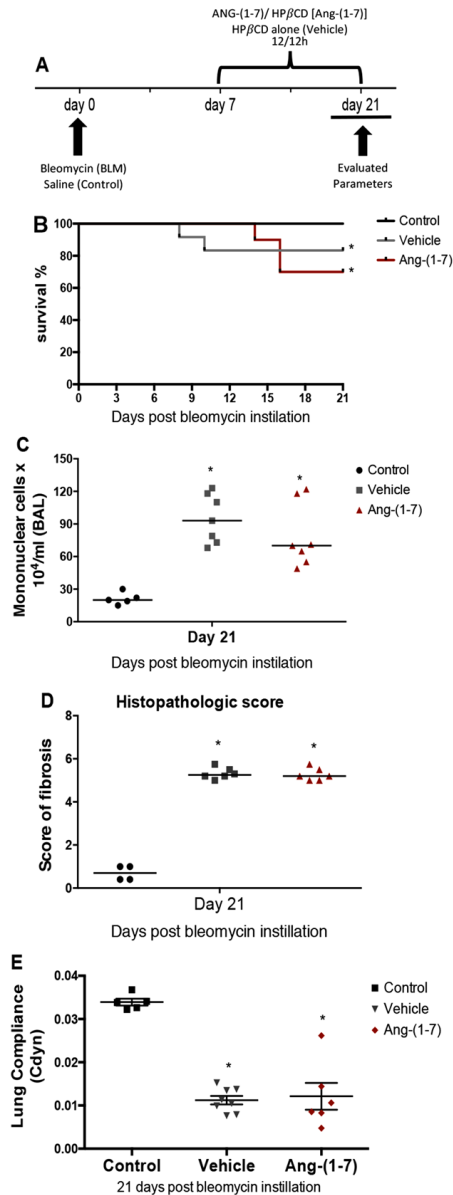


FIGURE 8 Therapeutic effects of Ang-(1-7) treatment on the survival, number of mononuclear cells, score of fibrosis, and compliance in lungs of animals instilled with bleomycin. Lung fibrosis was induced by a single bleomycin instillation (3 mg/kg) on day 0. Control animals received an instillation of saline alone (black circles). Ang-(1-7) [Ang-(1-7)+ Vehicle-92 μ g/kg] (red triangles) and HP β CD (continued on the next column)

with Ang-(1-7) was associated with decreased lung fibrosis and collagen content, suggesting that prevention of leukocyte influx may underlie the beneficial effects of Ang-(1-7) in the model. The observation that the effects of Ang-(1-7) are lost after day 3 are in agreement of the last idea, as leukocyte influx peaks in the first few days after BLM instillation.

Collagen is produced by interstitial fibroblasts that differentiate in myofibroblasts activated by its binding to TGF- β . Thus, activation of fibroblasts by TGF- β is an important and essential step by which fibrosis develops.²⁶ Previous studies have shown that the incubation of human lung fibroblasts with the Ang-(1-7) agonist, A779, reduced levels of TGF- β and collagen type I.²⁷ Therefore, a direct effect of Ang-(1-7) on myofibroblast could have accounted for the antifibrotic effects observed. However, the effects of Ang-(1-7) administration were decreased and eventually lost when the compound was started from 3 days after BLM instillation. As collagen production peaks between days 7 and 14 (data not shown), as observed on day 14 collagen deposition is significantly increased, it seems that there is no direct effect of Ang-(1-7) on myofibroblast function and it does not appear that these cells are the major cellular site of action of this molecule in our system, emphasizing its preventive, but not therapeutic effect. Therefore, although the study of fibroblast and myofibroblast activation is relevant for the study of drugs that affect fibrosis, Ang-(1-7) was only effective at early stages of BLM-induced fibrosis, suggesting an effect on these cells was an unlikely mechanism of action of the drug in the system.

In addition, the improvement of pulmonary inflammation and fibrosis followed by improved pulmonary function are likely due to Ang-(1-7) ability to decrease lung fibrosis. Collagen deposition is known to reduce lung compliance and to increase lung RI, as observed in our model of BLM-induced lung fibrosis.

At least two other studies have shown that administration of Ang-(1-7) is beneficial in rat models of BLM-induced lung fibrosis.^{3,12} In the latter studies, Ang-(1-7) was given by a subcutaneous route and only as a preventive therapy. Therefore, this is the first study to show the oral efficacy of Ang-(1-7) administration and to suggest that efficacy is restricted to early treatment (either preventive or the first few

(Vehicle-92 μ g/kg) alone (gray squares) in A, B, and D. In C, control animals are shown as black squares, Ang-(1-7) [Ang-(1-7)+ Vehicle-92 μ g/kg] as red diamonds and HP β CD (Vehicle-92 μ g/kg) alone as gray triangles. Treatment administration was orally performed twice a day starting 7 days after bleomycin instillation. Treatment scheme is shown in (A). Survival was monitored daily (B). Number of mononuclear cells (C) in bronchoalveolar lavage fluid was counted on day 21 after bleomycin instillation ($n = 5$ for control group, 7 for vehicle and Ang-(1-7)). In (E), analyses of dynamic complacency (Cdyn) is shown ($n = 5$ for control group, 6 for vehicle and Ang-(1-7)). Results are shown in median values. There were six animals per group. Results represent * for $P < 0.05$ when compared to the control group and # for $P < 0.05$ when compared to the vehicle-treated group and are from one experiment representative of two experiment

days after BLM administration). The loss of efficacy correlates with the decrease in tissue inflammation and increase in fibrosis after BLM instillation, again suggesting that an effect in the early stages account for the observed effects.

At least one other study has shown the effect of another proresolving molecule, resolving D1,²⁸ in a model of fibrosis in mice. Indeed, treatment with resolving D1 decreased inflammatory cell recruitment, production of TGF- β , and collagen content in a murine model of BLM-induced lung fibrosis.²⁹ In the latter experiments, resolving D1 was effective even when given many days after BLM instillation. In contrast, therapeutic administration of Ang-(1-7), which also has clear proresolving activities,²⁸ failed to decrease BLM-induced lung fibrosis at a dose that worked in a preventive manner. Further studies are necessary to define whether proresolving molecules (as a class and not only resolving D1) are actually capable of treating and decreasing established fibrosis. In our studies, the proresolving molecule Ang-(1-7) failed to have that effect.

In conclusion, our study clearly showed the strong effects of the preventive oral administration of Ang-(1-7) in a model of BLM-induced lung fibrosis. However, therapeutic effects are lost when treatment is started only a few days after the fibrogenic stimulation. These results suggest Ang-(1-7) may not be useful in patients with ongoing fibrosis. Further studies are clearly needed to identify any beneficial therapeutic effect of other proresolving molecules.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ilma Marçal for technical assistance. This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais-PRPq, Brazil (Programa de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-Contratados), and the National Institute of Science and Technology in Dengue and host-parasite interactions (INCT Dengue, CNPq 465425/2014-3).

AUTHORSHIP

Author contribution: F.R., R.C.R., and M.M.T. designed research, analyzed data, and wrote the paper. F.R., E.M.M., and I.G. performed experiments and analyzed data. R.C.R. and L.R.K. evaluated the assessment of pulmonary spirometry. G.D.C. and F.R. performed histological analysis.

DISCLOSURES

The authors declare the submitted work was not carried out in the presence of any personal, professional, and financial relationships that could potentially be construed as a conflict of interest.

ORCID

Remo C. Russo  <https://orcid.org/0000-0002-1715-3834>

REFERENCES

- Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir Med*. 2018;6:138-153.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:788-824.
- Meng Y, Li T, Zhou GS, et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/Mas axis protects against lung fibroblast migration and lung fibrosis by inhibiting the NOX4-derived ROS-mediated RhoA/Rho kinase pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22:241-258.
- Meng Y, Yu CH, Li W, et al. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas axis protects against lung fibrosis by inhibiting the MAPK/NF- κ B pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50:723-736.
- Rangarajan S, Bone NB, Zmijewska AA, et al. Metformin reverses established lung fibrosis in a bleomycin model. *Nat Med*. 2018;24:1121-1127.
- Gamad N, Malik S, Suchal K, et al. Metformin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: pharmacological effects and molecular mechanisms. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:1544-1553.
- Barratt SL, Mulholland S, Al Jbour K, et al. South-West of England's experience of the safety and tolerability pirfenidone and nintedanib for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Front Pharmacol*. 2018;9:1480.
- Bondue B, Castiaux A, Van Simaey G, et al. Absence of early metabolic response assessed by 18F-FDG PET/CT after initiation of antifibrotic drugs in IPF patients. *Respir Res*. 2019;20:10.
- Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, et al. An official American Thoracic Society Workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56:667-679.
- Li X, Molina-Molina M, Abdul-Hafez A, et al. Angiotensin converting enzyme-2 is protective but downregulated in human and experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2008;295:L178-L185.
- Li P, Xiao HD, Xu J, et al. Angiotensin-converting enzyme N-terminal inactivation alleviates bleomycin-induced lung injury. *Am J Pathol*. 2010;177:1113-1121.
- Meng Y, Yu C, Cai S & Li X. Anti-fibrotic effects of angiotensin1-7 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2013;93:1585-1589.
- Campa CC, Silva RL, Margaria JP, et al. Inhalation of the prodrug PI3K inhibitor CL27c improves lung function in asthma and fibrosis. *Nat Commun*. 2018;9:5232.
- Marques FD, Ferreira AJ, Sinisterra RD, et al. An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. *Hypertension*. 2011;57:477-83.
- Rodrigues-Machado MG, Magalhães GS, Cardoso JA, et al. AVE 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma. *Br J Pharmacol*. 2013;170:835-46.
- Barroso LC, Magalhaes GS, Galvão I, et al. Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Front Immunol*. 2017;8:1596.
- Magalhaes GS, Barroso LC, Reis AC, et al. Angiotensin-(1-7) promotes resolution of eosinophilic inflammation in an experimental model of asthma. *Front Immunol*. 2018;9:58.
- Russo RC, Savino B, Mirolo M, et al. The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2⁺ and CCR5⁺ IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells in mice. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2018;314:L1010-L1025.

19. Tavares LP, Garcia CC, Vago JP, et al. Inhibition of phosphodiesterase-4 during *Pneumococcal pneumonia* reduces inflammation and lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55:24-34.
20. Russo RC, Alessandri AL, Garcia CC, et al. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45:72-80.
21. Tavares LP, Garcia CC, Machado MG, et al. CXCR1/2 antagonism is protective during influenza and post-influenza pneumococcal infection. *Front Immunol*. 2017;8:1799.
22. Russo RC, Garcia CC, Barcelos LS, et al. Phosphoinositide 3-kinase γ plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Leukoc Biol*. 2010;89:269-282.
23. Kolaczowska E & Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:159-175.
24. Lima KM, Vago JP, Caux TR, et al. The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1. *J Biol Chem*. 2017;292:13758-13773.
25. Li G, Jin F, Du J, et al. Macrophage-secreted TSLP and MMP9 promote bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;366:10-16.
26. Pitha I, Oglesby E, Chow A, et al. Rho-kinase inhibition reduces myofibroblast differentiation and proliferation of scleral fibroblasts induced by transforming growth factor β and experimental glaucoma. *Transl Vis Sci Technol*. 2018;7:6.
27. Zhou JP, Tang W, Feng Y, et al. Angiotensin-(1-7) decreases the expression of collagen I via TGF- β 1/Smad2/3 and subsequently inhibits fibroblast-myofibroblast transition. *Clin Sci*. 2016;130:1983-1991.
28. Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M & Teixeira MM Mediators of the resolution of the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2019;40:212-227.
29. Yatomi M, Hisada T, Ishizuka T, et al. 17(R)-Resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Physiol Rep*. 2015;3:pii: e12628.

SUPPORTING INFORMATION

Additional information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Rago F, Melo EM, Kraemer L, et al. Effect of preventive or therapeutic treatment with angiotensin 1–7 in a model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Leukoc Biol*. 2019;1-10. <https://doi.org/10.1002/JLB.MA1218-49ORR>

4.2 Capítulo 2 – Influenza A e lipoxina A₄

4.2.1 Materiais e métodos:

4.2.1.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos C57BL/6j, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal De Minas Gerais (UFMG), com idade de 8 a 10 semanas, pesando entre 18-25g. Os animais *knockout* para FPR2 foram cedidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Durante o período experimental, os animais ficaram mantidos em gaiolas, no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG. Os animais tiveram livre acesso à água e ração; a temperatura foi mantida entre 22-25°C e o ciclo claro/escuro foi de 12 horas. Todos os procedimentos foram avaliados e realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFMG (CEUA - UFMG), sob o protocolo 65/2021.

4.2.1.2 Infecção com Influenza A

A cepa de Influenza A/WSN/33 H1N1 foi produzida em ovos de galina e, então, cultivadas em células MDCK como descrito previamente (GARCIA *et al.*, 2010). Os animais foram anestesiados, por via subcutânea, com 80 a 100 mg/kg de cetamina e 10-15 mg de xilasina e, em seguida, instilados com 10⁴ PFU (dose letal 50%) como descrito previamente (TAVARES *et al.*, 2017).

4.2.1.3 Tratamento com benzo-lipoxina A₄ (benzo-LXA₄)

Benzo-LXA₄ é um análogo de lipoxina A₄ em que um grupamento aromático é adicionado ao composto para diminuir a sua rápida inativação metabólica, sintetizado no Centro de Sínteses e Biologia Química da Universidade de Dublin (UCD) (TIMOTHY P. O’SULLIVAN *et al.*, 2007). Os animais tratados receberam a administração de benzo-LXA₄ foi feita por via intraperitoneal, uma vez ao dia todos os dias, na dose de 1,7µg/kg, no volume de 100µl e os animais não tratados receberam a administração de salina 0,9% + etanol 0,1%, no mesmo volume de 100µl como previamente descrito (BÖRGESON *et al.*, 2011; BRENNAN *et al.*, 2018b; TIMOTHY P. O’SULLIVAN *et al.*, 2007). A duração do tratamento variou de acordo com o experimento. No experimento de letalidade, a duração do tratamento foi do 3º dia após infecção até o 10º dia ou até o dia em que se observou alguma letalidade. No experimento em

que foram analisados parâmetros inflamatórios, o tratamento teve início no 3º dia após infecção até o 5º dia, dia da eutanásia dos animais em estudo.

4.2.1.4 Lavado bronco alveolar (BAL) e coleta dos pulmões

Após a análise da mecânica pulmonar, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico, e novamente canulados com um cateter de polipropileno de 1,7mm. O BAL foi realizado pela administração de duas alíquotas de 1 mL de tampão salina-fosfato (137mmol/L NaCl; 2.7mmol/L KCl; 10mmol/L Na₂HPO₄; 1.8 mmol/L KH₂PO₄pH 7,2) à 4°C. Cada uma dessas alíquotas foi injetada e removida 3 vezes obtendo, ao final, aproximadamente 2 mL do lavado, como previamente descrito (RUSSO *et al.*, 2009).

Após a coleta do BAL, os pulmões foram perfundidos com a administração de 5 mL de tampão salina-fosfato (PBS) no ventrículo direito para que os vasos sanguíneos e capilares pulmonares fossem lavados. Após a perfusão, o pulmão esquerdo (lobo único) foi coletado para posterior análise histológica e o pulmão direito foi coletado e congelado para posterior processamento e análise de: citocinas/quimiocinas, atividade da Mieloperoxidase (MPO) e histologia.

4.2.1.5 Avaliação de neutrófilos apoptóticos e eferocitose

Apoptose e eferocitose foram avaliadas morfológicamente como descrito previamente (GALVÃO *et al.*, 2017; VAGO *et al.*, 2012). Células do BAL foram coletadas no dia 5 pós infecção por Influenza. Leucócitos foram centrifugados fixados e corados com May-Grünwald-Giemsa e contados ao microscópio ótico usando óleo de imersão (objetiva de 100x) para determinar a proporção de neutrófilos totais e neutrófilos com morfologia apoptótica (retração celular, condensação de cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos dentro e fora de macrófagos). Do mesmo modo, para avaliação de eferocitose, foi determinada a proporção de macrófagos totais e macrófagos com corpos apoptóticos eferocitados. No mínimo 300 células foram contadas e o resultado foi expresso como mediana da porcentagem de células com as morfologias descritas.

A avaliação da eferocitose também foi demonstrada por meio de citometria de fluxo. Foram considerados macrófagos com perfil eferocítico células F4/80⁺/Ly6G⁺.

4.2.1.6 Citometria de fluxo

As células do BAL dos animais foram marcadas com anticorpos fluorescentes anti-F4/80 (25-4801- 82, PEcy7, eBioscience, USA). Após a marcação de superfície, as células foram fixadas com um tampão fixador e permeabilizadas com um tampão de permeabilização. As células foram então marcadas com um anticorpo fluorescente anti-Ly6G (127628, V421, Biolegend) e passadas no citômetro BD FACSCanto II cell (BD Biosciences). As análises foram feitas no software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

4.2.1.7 Western Blot para análise da expressão de iNOS e CD206

Amostras de pulmão foram lisadas pela adição de 500 μ L de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1mM de NaVO₃, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina), e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 12.000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C (centrífuga Jouan, modelo BR4i), sendo o sobrenadante alíquotado.

Para realizar a dosagem de proteínas totais, foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) baseado no método de Bradford. O ensaio foi realizado em uma microplaca de 96 poços, e consiste na adição de 2 μ L de cada amostra a 200 μ L do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente é realizado uma curva padrão utilizando como solução padrão BSA 1mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura é feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 595 nm. A absorbância das amostras é comparada com a absorbância da curva, com concentrações variando de 0.063 mg/mL a 2 mg/mL e os resultados são expressos em mg/mL.

Os extratos protéicos totais (60 μ g) foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão (10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250M Tris/HCl pH 6,8) e a mistura mantida a 100°C por 5 minutos. Os extratos protéicos foram fracionados em gel de 10-15% de poliacrilamida/SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose (HybondTM ECLTM, GE Healthcare). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, lavadas com PBS-Tween, e incubadas com o anticorpo de interesse a 4°C overnight (iNOS e CD206, Santa Cruz). Após nova lavagem com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário respectivo ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL-Plus (GE Healthcare) e as bandas imunorreativas foram visualizadas

usando ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories). As análises densitométricas foram realizadas usando o programa Image J.

4.2.1.8 Contagem total e diferencial dos leucócitos

Logo após a realização do BAL, o líquido recuperado foi centrifugado por 8 minutos a 1.800 RPM e 4°C. O sobrenadante foi coletado e congelado para posteriores análises de citocinas enquanto o precipitado formado foi separado e re-suspendido em 100 µL de BSA 3%. Essa suspensão de células foi homogeneizada e, uma alíquota, foi diluída 10x em uma solução de lise para hemácias (Solução de Turk - IMBRALAB). Essa solução contendo as células foi colocada em câmara de Neubauer e, então, foi realizada a determinação do total de leucócitos presentes nas vias aéreas utilizando-se um microscópio óptico (Motic BA310) com aumento de 400X.

A partir dessa contagem, um volume contendo aproximadamente 5×10^4 células foi diluído em 100 µL de BSA 3% para a confecção de lâminas em citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon) – centrifugação por 5 minutos a 450 rpm em temperatura ambiente. As Lâminas foram coradas com um Kit de panótico rápido seguindo o protocolo do fabricante (Renylab). A determinação diferencial da população de células foi realizada em microscópio óptico de campo claro com aumento de 1.000X em óleo de imersão. Foram contadas 300 células por lâmina, em campos aleatórios, e as células foram diferenciadas entre mononucleares, neutrófilos e eosinófilos. Os caracteres utilizados para a diferenciação das células foram: morfologia nuclear e citoplasmática e coloração nuclear e citoplasmática.

4.2.1.9 Processamento de pulmão para dosagem de citocinas e ensaio de mieloperoxidase (MPO)

Após a coleta, 50 mg do pulmão direito foi separado para ser processado para análise de citocinas e as respectivas atividades enzimáticas. A amostra foi homogeneizada em 500 mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0,05%, BSA 0,5%, 20 KI aprotinina) e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo microtubo e congelado para posterior análise.

O precipitado formado foi novamente homogeneizado em 0,95 mL de solução tampão 1 (NaCl 0,1 M; Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂EDTA 0,015 M; pH 4,7) e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para lisar eventuais hemácias, o precipitado foi submetido à lise hipotônica (0,75 mL de NaCl 0,2% seguido da adição de 0,75 mL de NaCl 1,6% +Glicose

5%.

Após centrifugados novamente a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C foi adicionado nos tubos 0,5 mL de tampão 2 (Na₃PO₄ 0,05M, HETAB 0,5%; pH 5,4) e as amostras foram homogeneizadas e submetidas à lise térmica. Para isso, as amostras foram congeladas e descongeladas por 3 vezes em nitrogênio líquido.

4.2.1.10 Ensaio da atividade da MPO

Após a lise térmica por criofratura através de 3 ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido, 25 µL das amostras diluídas 5 vezes em tampão 2 e foram adicionadas em placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 25 µL do reagente 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração de 1,6 mM e a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos.

Ao final desse período, foi adicionado 100 µL de H₂O₂ (0,002% em tampão 2) e a placa foi novamente incubada por 5 minutos a 37°C. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de H₂SO₄ 1M e a leitura da absorbância foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices) com um filtro para o comprimento de onda de 450 nm.

4.2.1.11 Dosagem de quimiocinas e citocinas

Os níveis de citocinas e quimiocinas foram quantificados por ELISA. Microplacas de 96 poços (Nunc Maxi Sorb) foram cobertas com anticorpo de captura, na diluição recomendada pelo fabricante, em tampão carbonato (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35 mM, Na₂HPO₄ 3.1 mM; pH 9,5) e incubados overnight.

Após a incubação, a placa foi lavada com PBS suplementado com 0,05% de Tween20, então, foi feito o bloqueio das reações inespecíficas, utilizando soluções de bloqueio recomendadas pelo fabricante (PBS-BSA 1%), por 1 hora. Posteriormente ao bloqueio, 100 µL das amostras ou de solução contendo concentrações seriadas das amostras avaliadas foram pipetados em duplicata e incubados por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada para retirar o excesso das amostras, e foram adicionados os respectivos anticorpos de detecção, nas concentrações recomendadas, por mais 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução de estreptavidina, por 30 minutos. As placas foram novamente lavadas com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução reveladora (OPD) da atividade da

peroxidase, por mais 30 minutos. A reação foi, então, bloqueada com a adição de 50 μ L de solução de bloqueio H₂SO₄ 2N e a leitura da absorbância determinada logo em seguida em 492 nm em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram expressas em pg/mL de sobrenadante a partir da análise da curva padrão através do software SOFTmax PRO 6.3 (Molecular Devices Corp.).

4.2.1.12 Ensaio de placa

Para determinar o título viral nos pulmões, os órgãos foram coletados, pesados e homogeneizados em um volume de PBS na proporção de 1ml para 100mg de tecido. O ensaio de placa foi realizado com previamente descrito (GARCIA et al., 2010). Para adsorção viral, as amostras foram diluídas e incubadas por 1 hora em uma monocamada de células MDCK. Então, foi adicionado às células 1% de agarose em DMEM seguida de incubação por 72 horas. As células foram fixadas e coradas com cristal de violeta para contagem de placas. O título viral foi expresso em numero de unidade formadora de placa (PFU) por grama de tecido (PFU/100mg de tecido)

4.2.1.13 Análise histológica e score inflamatório

Amostras de pulmão foram fixadas em formol neutro e tamponado a 10% e processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4 μ m foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (H&E), para análise do score histopatológico e coradas com Tricômio de Gomori, para as análises de fibrose pulmonar.

O *score* histopatológico foi realizado como descrito anteriormente por Garcia *et al.*, simultaneamente por dois patologistas experientes e de forma cega. O *score* de 18 pontos levou em consideração a inflamação das vias aéreas (até 4 pontos), inflamação perivascular (até 4 pontos), inflamação parenquimal (até 5 pontos) e infiltração de neutrófilos nos pulmões (até 5 pontos) (GARCIA *et al.*, 2010).

4.2.1.14 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados, bem como a elaboração dos gráficos, foi realizada com o auxílio do software *GraphPad Prism 7* (*GraphPad Software, Inc*). Testes estatísticos de normalidade como D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e KS foram utilizados para determinar se houve ou não normalidade nos resultados de cada grupo. Com o teste de normalidade positivo, aplicamos o teste T, o qual foi expresso como média \pm EPM (erro padrão da média).

Quando os resultados não passaram no teste de normalidade, foi então utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, o qual foi expresso como mediana. Foram considerados significativamente diferentes resultados com valor de p foi menor do que 0,05.

4.2.2 RESULTADOS

4.2.2.1 Avaliação do papel do receptor de lipoxina A₄- FPR2^{-/-} na inflamação pulmonar de animais infectados com Influenza A

Após testar o efeito do tratamento com benzo-LXA₄ na fibrose pulmonar induzida por sílica e verificar que o tratamento não apresentou efeito eficaz (figura suplementar), testamos o tratamento com essa molécula em um modelo de doença inflamatória aguda.

A Influenza A é uma doença viral que continua sendo a causa de um alto índice de mortalidade no mundo todo devido sua alta taxa de mutação gênica, permitindo sua evasão do sistema imune (HUTCHINSON, 2018). Apesar da existência de métodos de intervenção dessa doença como vacinação (PANDOLFI *et al.*, 2018) e terapias anti-inflamatórias - com o objetivo de bloquear mediadores inflamatórios relacionados a casos graves da doença visando reduzir os sintomas gerados - (TAVARES; TEIXEIRA; GARCIA, 2017), esse vírus ainda é o agente responsável por surtos sazonais em muitos países. Por isso, estudos que abrangem as possibilidades terapêuticas para essa doença continuam sendo necessários.

Uma vez que medidas terapêuticas com efeito anti-inflamatório são relevantes nesse contexto, moléculas com essa característica se tornam alvo de estudos que visam abranger as opções de tratamento para essa doença. Nesse estudo, tivemos como objetivo estudar o potencial terapêutico da lipoxina A₄ e o papel do seu receptor na infecção por IAV. A lipoxina A₄ é uma molécula com efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos bem descritos, porém ainda não se sabe o seu papel na infecção por IAV. Para isso, inicialmente, investigamos o papel do seu receptor na resposta imune durante essa infecção usando animais deficientes de FPR2 (receptor ao qual a lipoxina A₄ se liga). Após serem anestesiados, camundongos c57 machos selvagens (WT – *Wild type*) e deficientes para FPR2 (FPR2^{-/-}), foram instilados com 40µl de solução salina 0,9% (grupo Mock ou Mock FPR2^{-/-} – controle) ou infectados com um inóculo de 10⁴ PFU/animal, no mesmo volume, e eutanasiados 7 dias após o início da infecção. O peso dos animais foi checado diariamente durante todo o experimento.

Apesar da porcentagem do peso dos animais não ter sido diferente entre os grupos (figura 12B), os animais FPR2^{-/-} infectados com influenza apresentaram maior recrutamento celular para o BAL (figura 12C); sendo essas células mononucleares (figura 12D) e neutrófilos (figura 12E). Esse aumento foi significativamente maior nos animais FPR2^{-/-} do que nos animais WT. Apesar dos animais FPR2^{-/-} terem apresentado maior número de células recrutadas, eles não apresentaram um aumento de níveis de citocinas se comparados aos animais WT (figura 13).

Analizamos também a diferença do número de células presentes nos pulmões utilizando o corante Hematoxilina-Eosina. Observou-se um aumento de recrutamento celular nos pulmões dos animais infectados, se comparados aos animais Mock. Além disso, animais FPR2^{-/-} infectados com IAV apresentaram maior score inflamatório se comparados aos animais WT infectados (figura 14)

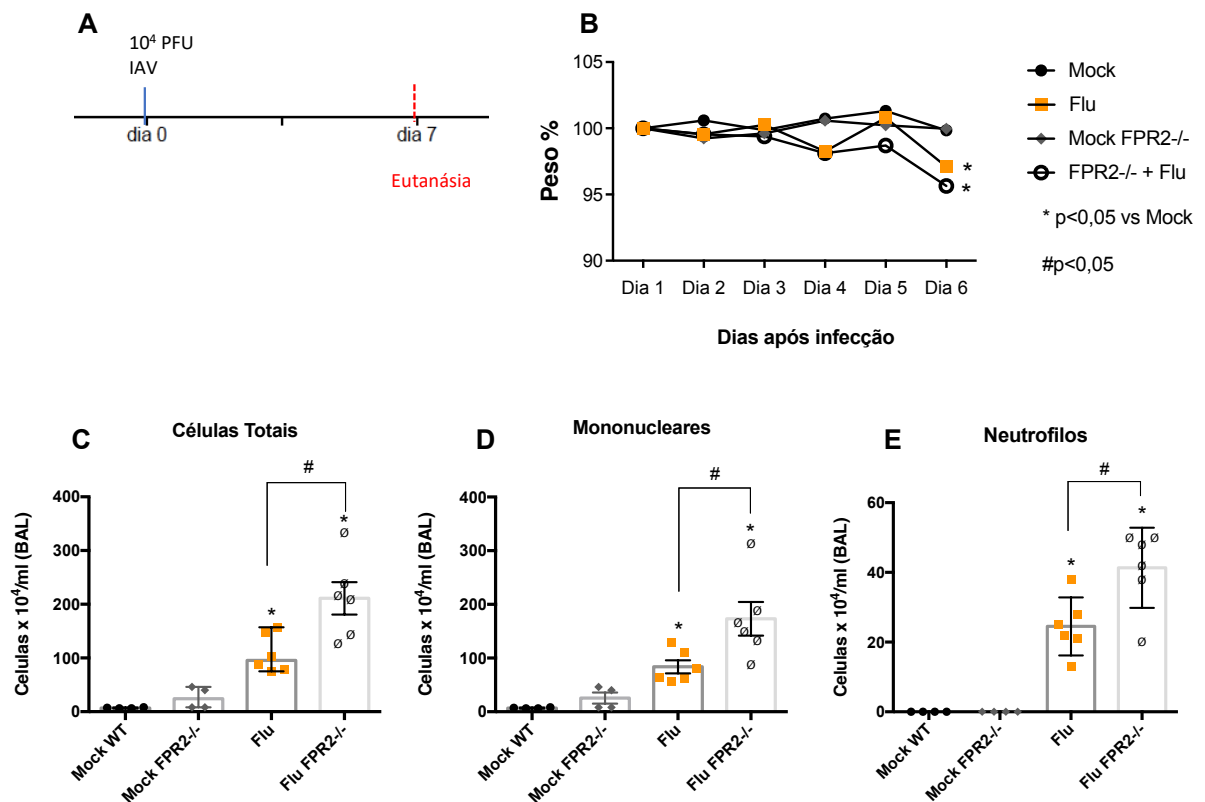


Figura 12 – Papel do receptor FPR2 na infecção por Influenza A em camundongos. Animais não infectados (Mock) selvagens (WT - Wild Type) e deficientes de FPR2 (FPR2^{-/-}); e animais WT infectados (Flu) e FPR2^{-/-} infectados (Flu FPR2^{-/-}) foram representados. Os Animais foram infectados com 10⁴ PFU de IAV no dia 0 e eutanasiados no dia 7 após infecção (A). Peso diário dos animais estudados (B). Análise celular do BAL com números de células totais (C), mononucleares (D) e neutrófilos (E). Valores expressos como média ± EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 4 – 6. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controles (*=p<0,05); #=p<0,05.

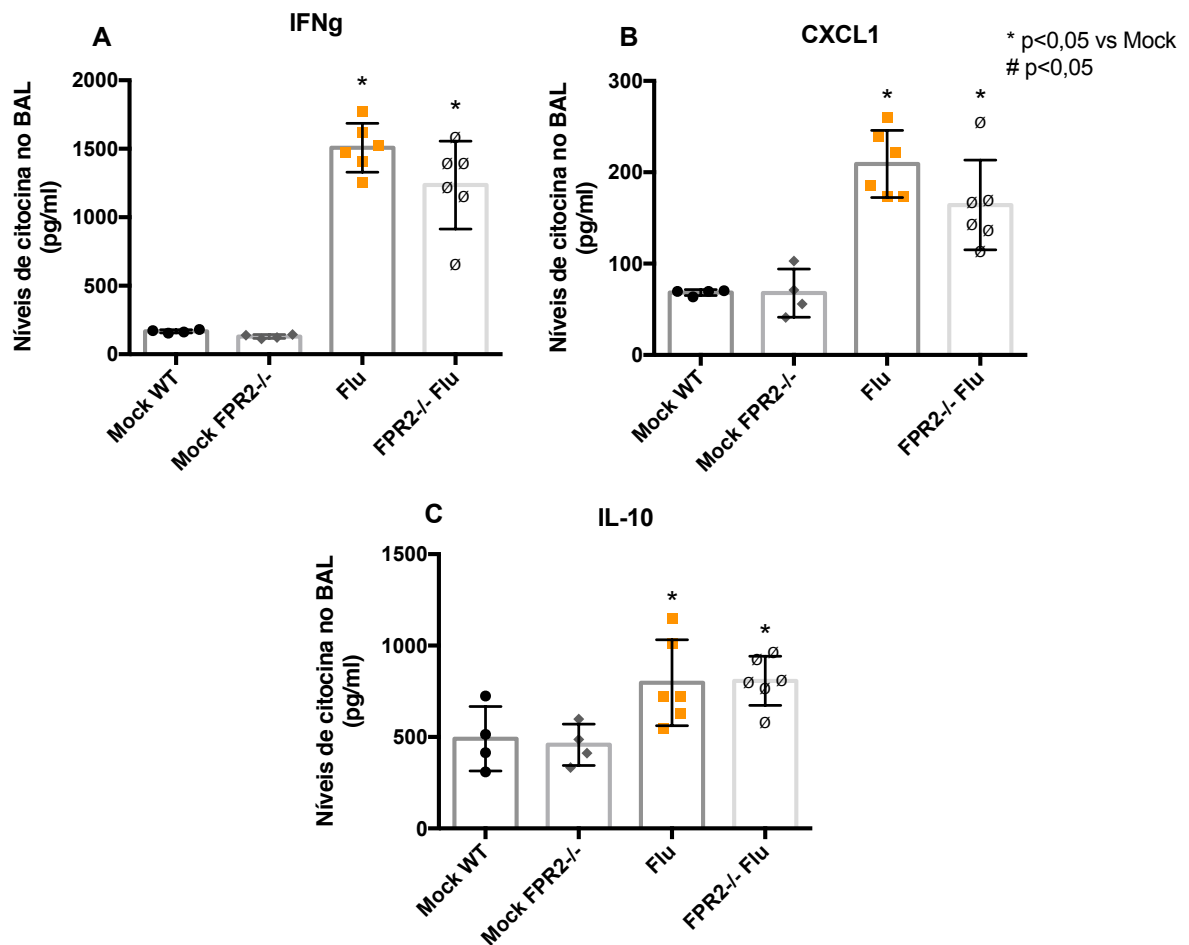


Figura 13 – Papel do receptor FPR2 nos níveis de citocinas no BAL de animais infectados com Influenza A. Os Animais foram infectados com 10^4 PFU de IAV no dia 0 e eutanasiados no dia 7 após infecção. Animais não infectados (Mock) selvagens (WT - Wild Type) e deficientes de FPR2 (FPR2^{-/-}); e animais WT infectados (Flu) e FPR2^{-/-} infectados (Flu FPR2^{-/-}) foram representados. Animais foram infectados com 10^4 PFU de IAV no dia 0 e eutanasiados no dia 7 após infecção. Níveis de IFN γ no BAL (A). Níveis de CXCL1 no BAL (B). Níveis de IL-10 no BAL (C). Valores expressos como média \pm EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n = 4 – 7. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controles (*=p<0,05); #=p<0,05.

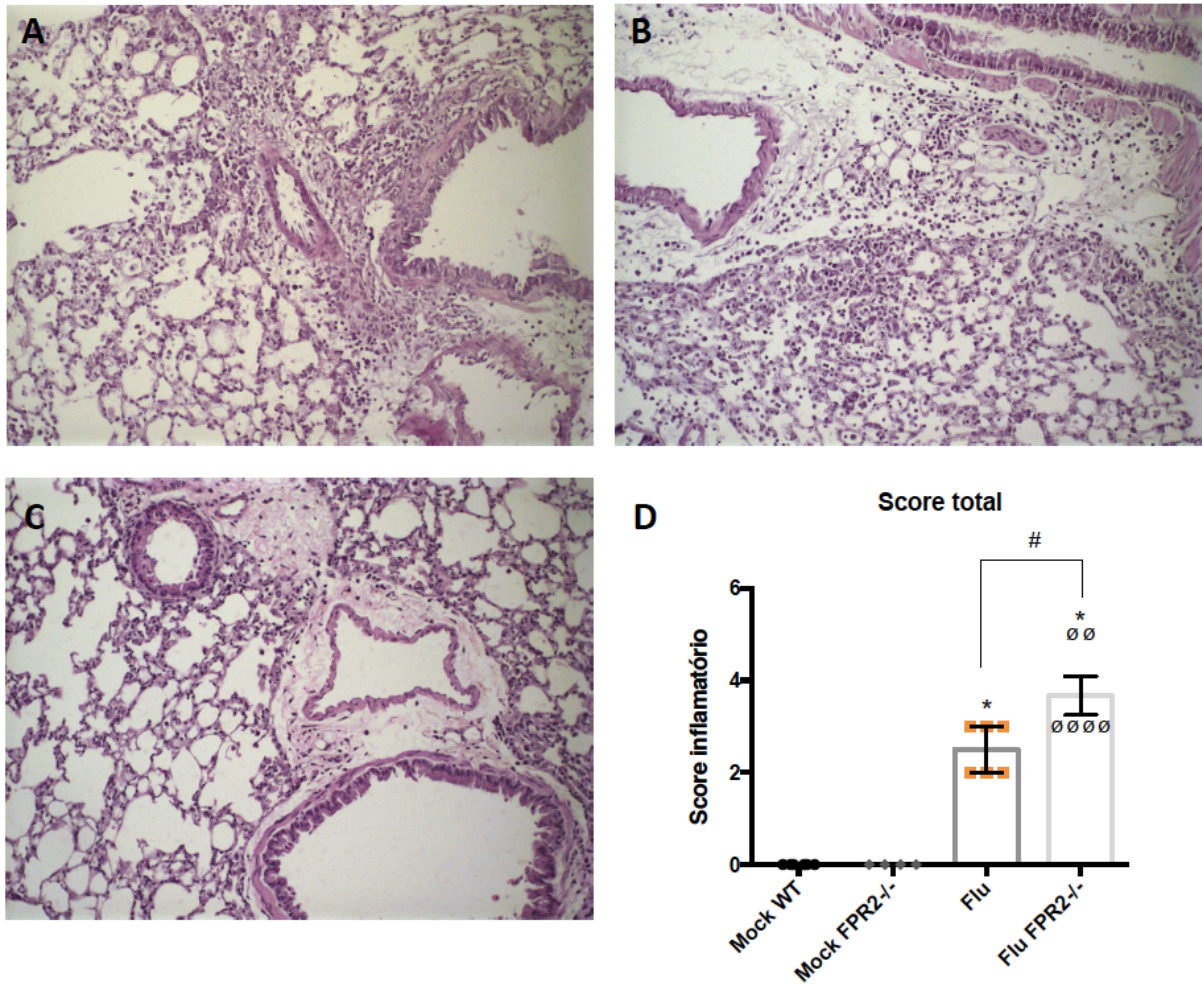


Figura 14 – Histologia pulmonar de animais WT e FPR2^{-/-} infectados com influenza. Os Animais foram infectados com 10⁴ PFU de IAV no dia 0 e eutanasiados no dia 7 após infecção. Cortes histológicos do grupo WT infectado (Flu) (A), do grupo FPR2^{-/-} infectado (Flu FPR2^{-/-}) (B) e dos grupos controles WT e FPR2^{-/-} (Mock WT e Mock FPR2^{-/-}, respectivamente) (C). Aumento de 20x. Coloração Hematoxilina-Eosina. Score inflamatório total (inflamação das vias aéreas, inflamação vascular e inflamação parenquimal) (D). Valores expressos como média ± EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 4 – 6. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controles (*=p<0,05); #=p<0,05.

4.2.2.2 Avaliação do tratamento com o análogo de lipoxina A₄ (benzo-lipoxina A₄) em animais infectados com Influenza A

Após verificarmos a importância do receptor de lipoxina A₄ no controle do processo inflamatório no contexto de infecção por Influenza, resolvemos testar o análogo dessa molécula como estratégia terapêutica para tratar essa infecção.

Benzo-lipoxina A₄ (benzo) é um análogo de lipoxina A₄ produzido por nossa colaboradora na Irlanda, Dr. Catherine Godson, em que um grupo benzeno é adicionado com o objetivo de deixar a molécula de lipoxina mais estável possibilitando sua administração via intraperitoneal (TIMOTHY P. O'SULLIVAN *et al.*, 2007).

Assim, após serem anestesiados com 80 a 100 mg/kg de cetamina e 10-15 mg de xilasina camundongos c57 machos, entre 8-12 semanas, foram instilados com 40µl solução salina 0,9% (grupo Mock – controle) ou infectados com um inóculo de 10⁴ PFU/animal, no mesmo volume. Os animais infectados foram divididos em tratados com benzo e não tratados. Animais não tratados receberam 100µl de veículo – solução salina 0,9% + 0,1% de etanol. O tratamento com 100µl de benzo, na dosagem de 1,7µg/kg, foi diário, via i.p (BRENNAN *et al.*, 2018a) a partir do 3º dia após a infecção. Os animais foram eutanasiados no 5º dia após o início da infecção como demonstrado anteriormente (MELO *et al.*, 2021a).

O tratamento com o análogo de lipoxina A₄ tendeu a aumentar a sobrevivência dos animais (figura 15B). Não houve diferença tanto na perda de peso (figura 15C) quanto na carga viral (figura 15D) dos animais tratados quando comparados aos animais não tratados. Animais infectados apresentaram aumento nos números de células totais (figura 16A) no BAL, sendo elas neutrófilos (figura 16B) e mononucleares (figura 16C). O tratamento gerou diminuição do número dessas células (figura 16) mas não gerou diferença na expressão de iNOS e CD206 (figuras 16 D, E e F). Os animais tratados também apresentaram diminuição nos níveis de IFN γ no BAL se comparado aos animais não tratados (figura 17A). Porém, essa diminuição não foi observada nos níveis de CXCL1 e IL-10 (figuras 17B e 17C, respectivamente). O tratamento gerou um aumento significativo no número de células apoptóticas (figuras 18A e B) e de eferocitose (figuras 18C e D e figura 19). Além disso, as análises histológicas dos pulmões dos animais mostraram que o tratamento diminuiu significativamente a inflamação pulmonar das vias aéreas, inflamação vascular e parenquimal (representadas pelo score inflamatório total) se comparado à inflamação observada nos pulmões de animais infectados e não tratados (figura 20).

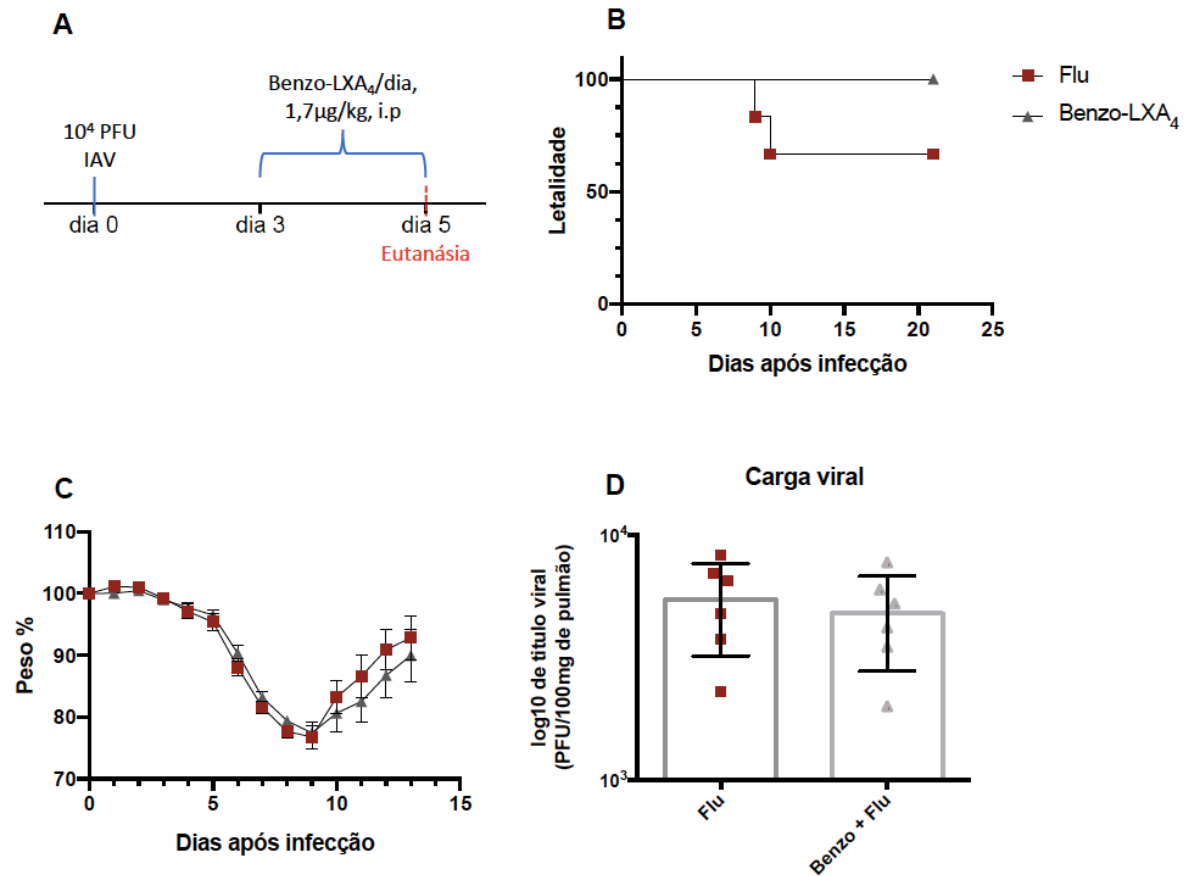


Figura 15 – Efeito do tratamento com benzo-LXA₄ na letalidade, na perda de peso e na carga viral de animais infectados com IAV. Animais foram instilados com 10⁴ PFU de IAV WSN ou com salina 0,9% (Mock – controle) no volume de 40µl. No 3^o dia após infecção, os animais infectados foram divididos em tratados com benzo-LXA₄ (Benzo + Flu) e tratados com veículo (Flu). Todos os animais foram sacrificados no 5^o dia após infecção (A). Animais não infectados (Mock – círculo preto) e animais infectados não tratados (Flu – quadrado vermelho) e animais infectados e tratados (triângulo cinza) foram representados. Análise da letalidade (B). Perda de peso (C). Carga viral (D). Valores expressos como média ± EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 6. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controles (*=p<0,05); #=p<0,05).

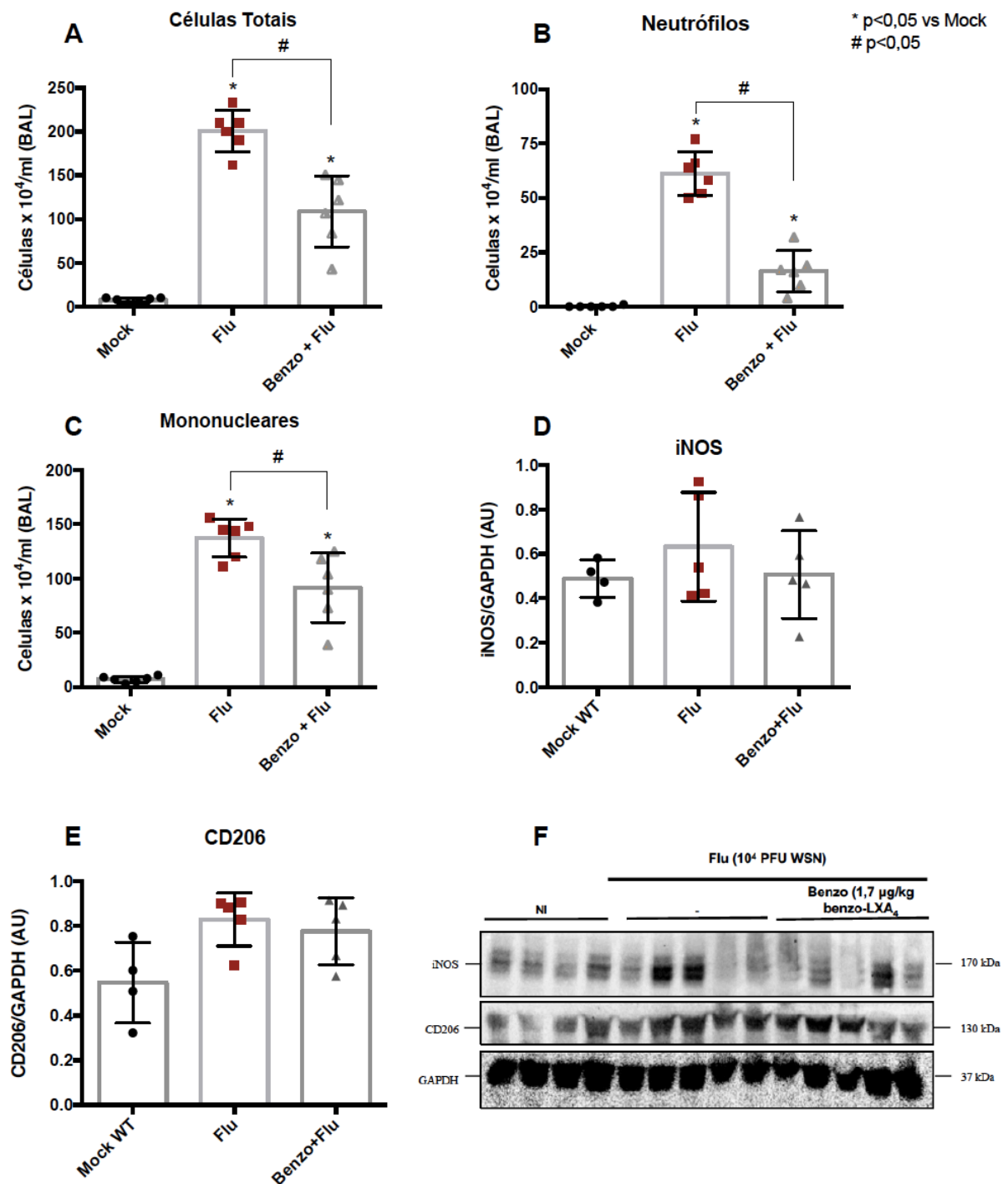


Figura 16 – Efeito do tratamento com benzo-LXA₄ no recrutamento celular e nos processos de apoptose e eferocitose. Animais foram instilados com 10⁴ PFU de IAV WSN ou com salina 0,9% (Mock – controle) no volume de 40µl. No 3º dia após infecção, os animais infectados foram divididos em tratados com benzo-LXA₄ (Benzo + Flu) e tratados com veiculo (Flu). Todos os animais foram sacrificados no 5º dia após infecção. Animais não infectados (Mock – circulo preto), animais infectados não tratados (Flu – quadrado vermelho) e animais infectados e tratados (triângulo cinza) foram representados. Análise celular do BAL com números de células totais (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C). Expressão de iNOS (D). Expressão de CD206 (E). Gel Western Blot (F). Valores expressos como média ± EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 6. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controles (*=p<0,05); #=p<0,05).

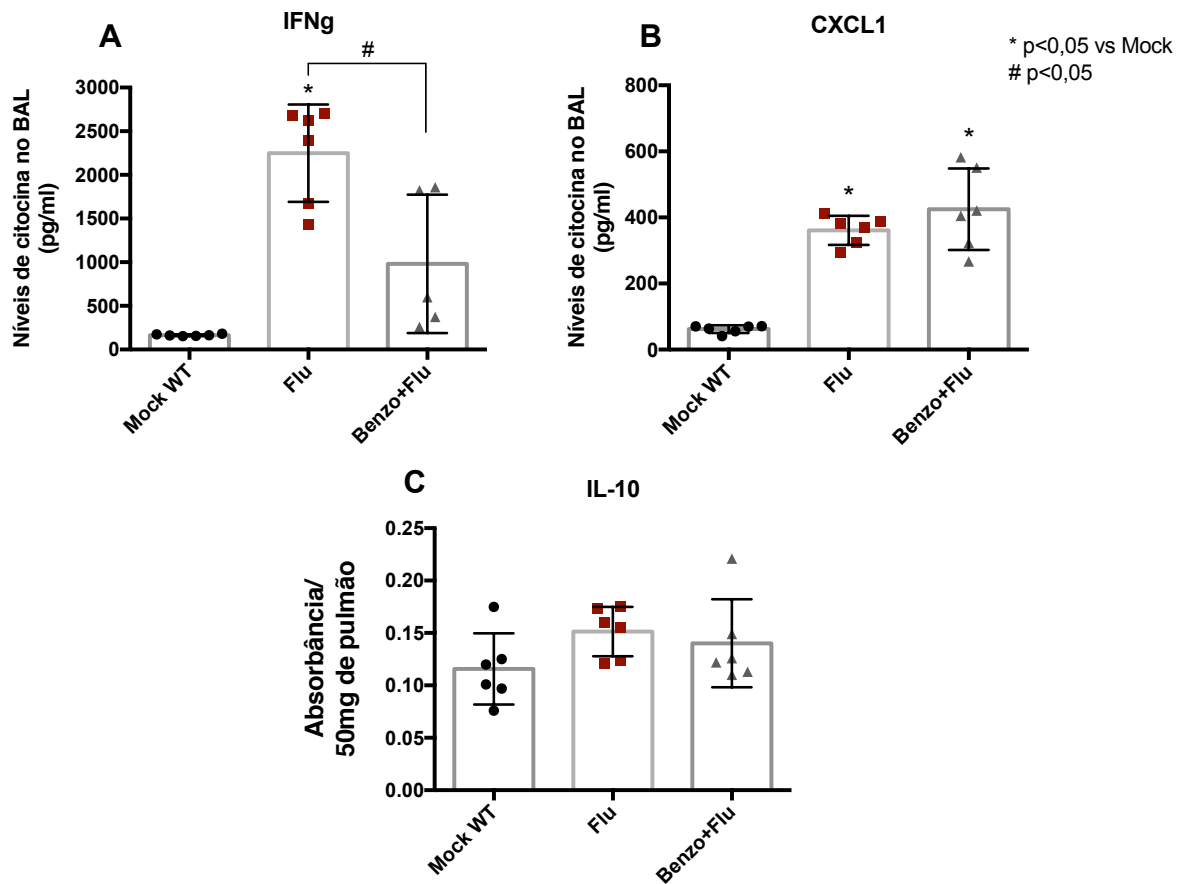


Figura 17 – Efeito do tratamento com benzo-LXA₄ nos níveis de citocinas no BAL. Animais foram instilados com 10⁴ PFU de IAV WSN ou com salina 0,9% (Mock – controle) no volume de 40 μ l. No 3^o dia após infecção, os animais infectados foram divididos em tratados com benzo-LXA₄ (Benzo + Flu) e tratados com veículo (Flu). Todos os animais foram sacrificados no 5^o dia após infecção. Animais não infectados (Mock – círculo preto), animais infectados não tratados (Flu – quadrado vermelho) e animais infectados e tratados (triângulo cinza) foram representados. Níveis de IFN γ no BAL (A). Níveis de CXCL1 no BAL (B). Níveis de IL-10 no BAL (C). Valores expressos como média \pm EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n = 6. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controles (*=p<0,05); #=p<0,05.

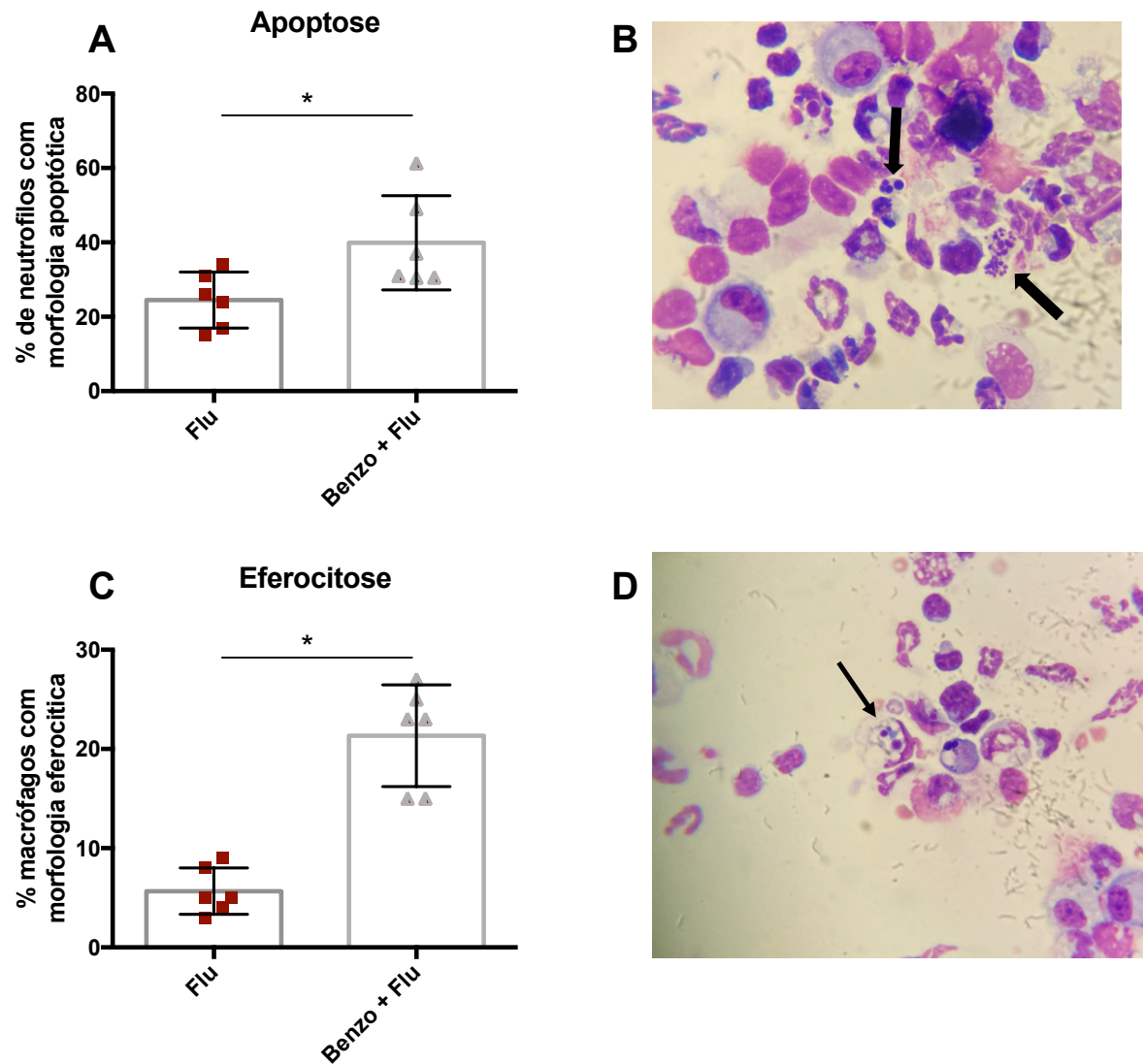


Figura 18 – Análise morfológica do processo de apoptose e eferocitose em animais infectados com influenza e tratados ou não com benzo-LXA₄. Animais foram instilados com 10⁴ PFU de IAV WSN ou com salina 0,9% (Mock – controle) no volume de 40µl. No 3º dia após infecção, os animais infectados foram divididos em tratados com benzo-LXA₄ (Benzo + Flu) e tratados com veículo (Flu). Todos os animais foram sacrificados no 5º dia após infecção. Animais infectados não tratados (Flu – quadrado vermelho) e animais infectados e tratados (triângulo cinza) foram representados. Número de neutrófilos com morfologia apoptóticas em relação ao total de neutrófilos (A). Imagem demonstrativa da morfologia de neutrófilos apoptóticos (setas grossas) (B). Número de macrófagos com morfologia eferocítica em relação ao total de macrófagos (C). Imagem demonstrativa da morfologia do processo de eferocitose (seta fina) (D). Valores expressos como média ± EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 6. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controles (*=p<0,05); #=p<0,05.

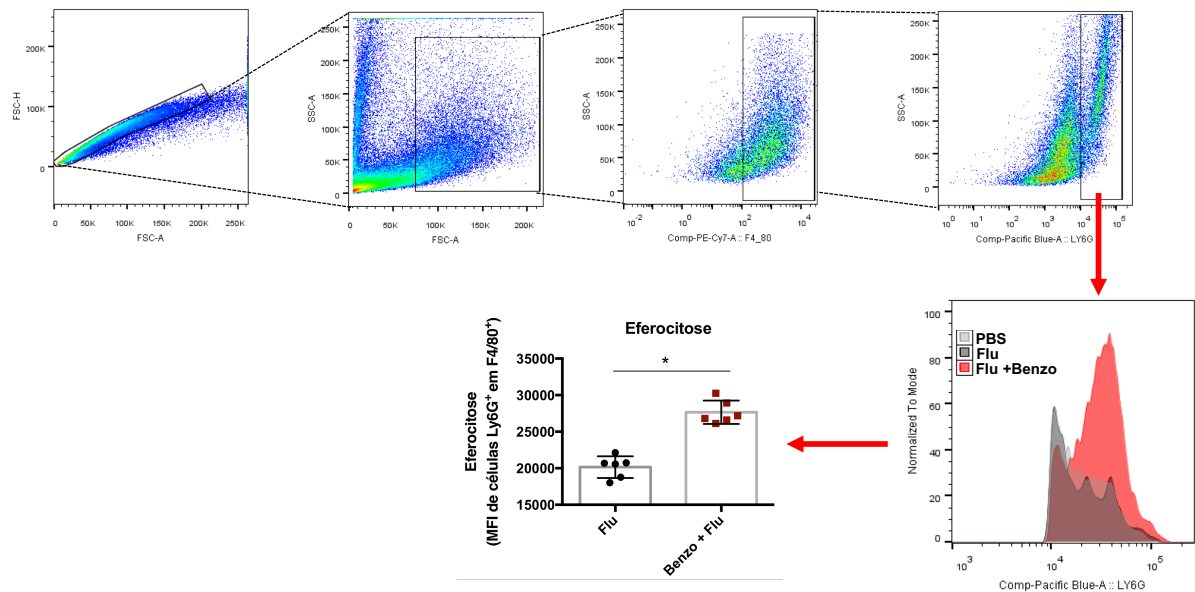


Figura 19 – Estratégia de gate de citometria de fluxo para eferocitose em animais infectados com influenza e tratados ou não com benzo-LXA₄. Animais foram instilados com 10^4 PFU de IAV WSN ou com salina 0,9% (Mock – controle) no volume de $40\mu\text{l}$. No 3º dia após infecção, os animais infectados foram divididos em tratados com benzo-LXA₄ (Benzo + Flu) e tratados com veículo (Flu). Todos os animais foram sacrificados no 5º dia após infecção. Animais infectados não tratados (Flu – quadrado vermelho) e animais infectados e tratados (triângulo cinza) foram representados. Número de células F4/80⁺/Ly6G⁺. Valores expressos como média \pm EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde $n=6$.; #= $p<0,05$.

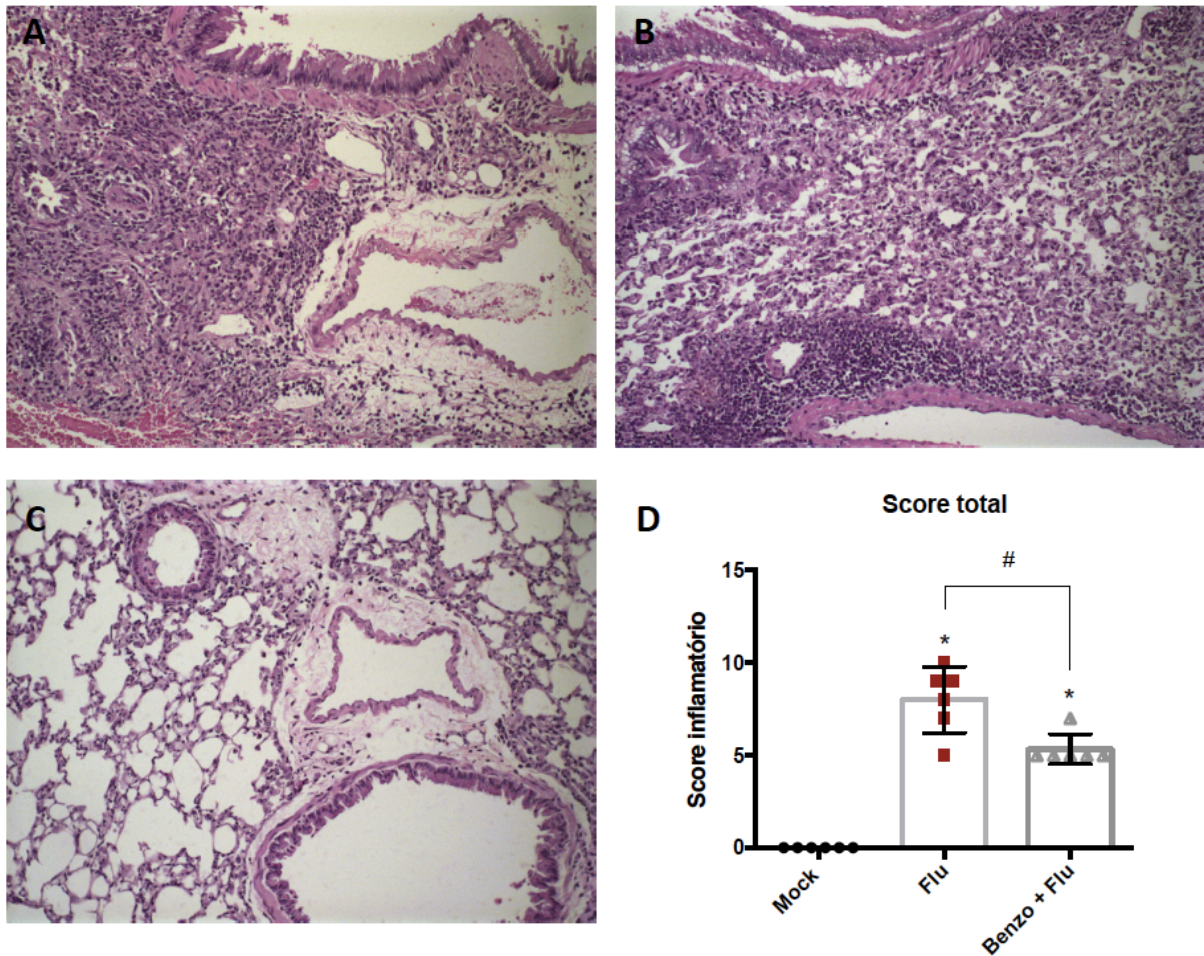


Figura 20 - Histologia pulmonar de animais infectados com influenza tratados ou não com benzo-LXA₄. Animais foram instilados com 10⁴ PFU de IAV WSN ou com salina 0,9% (Mock – controle) no volume de 40µl. No 3º dia após infecção, os animais infectados foram divididos em tratados com benzo-LXA₄ (Benzo + Flu) e tratados com veículo (Flu). Todos os animais foram sacrificados no 5º dia após infecção. Cortes histológicos do grupo infectado e não tratado (Flu) (A), do grupo infectado e tratado com benzo-LXA₄ (Benzo + Flu) (B) e do grupo controle (Mock) (C). Aumento de 20x. Coloração Hematoxilina-Eosina. Score inflamatório total (inflamação das vias aéreas, inflamação vascular e inflamação parenquimal) (D). Valores expressos como média ± EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde n= 6. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controles (*=p<0,05); #=p<0,05.

4.2.3 DISCUSSÃO

Lipoxina A₄ é capaz de diminuir respostas inflamatórias em doenças pulmonares (LI, YUHUA *et al.*, 2021; SEKHERI *et al.*, 2020) e possui um papel importante no reparo e homeostase tecidual (TAN *et al.*, 2017). Porém, pouco se sabe sobre seu papel na infecção por Influenza A.

Visto isso, decidimos estudar o papel da LXA₄ durante a infecção analisando animais deficientes para seu receptor – FPR2 – e seu efeito como medida terapêutica para tratar animais infectados com IAV. Nossos dados mostraram que (i) animais FPR2^{-/-} apresentaram maior susceptibilidade à infecção do que animais WT. Essa susceptibilidade foi associada ao (ii) aumento do recrutamento celular para o BAL e (iii) para os tecidos desses animais juntamente com aumento de dano tecidual. Ainda que (iv) LXA₄ não tenha apresentado efeito benéfico em um modelo de fibrose pulmonar induzida por sílica (material suplementar), (v) quando usada como medida terapêutica em um modelo de infecção por IAV gerou aumento da taxa de sobrevivência de animais tratados, o que foi associado à (vi) diminuição de células no BAL e nos (vii) pulmões desses animais, assim como à (viii) diminuição do dano pulmonar e ao (ix) aumento dos números de células apoptóticas e à eferositose dessas células.

O papel do FPR2 vem sendo investigado em modelos de infecção por IAV. Em 2017, Courtin *et al.* demonstraram o efeito antiviral de antagonistas de FPR2 *in vitro* e *in vivo*. Eles demonstraram que quando células epiteliais pulmonares eram pré tratadas com antagonistas de FPR2 e infectadas com IAV PR8 havia uma redução significativa na produção de partícula virais dosadas no meio de cultura dessas células se comparado a quantidade de partículas virais no meio de cultura de células não tratadas. Eles também estudaram o efeito desses antagonistas em camundongos infectados com IVA PR8. Análises do sexto dia após infecção mostraram uma diminuição do título viral, assim como aumento da sobrevivência dos animais quando tratados com os antagonistas um dia antes da infecção. Da mesma maneira, quando o tratamento ocorreu no mesmo dia da infecção, os animais tratados apresentaram uma maior taxa de sobrevivência se comparado aos animais não tratados (COURTIN *et al.*, 2017). Por outro lado, outros estudos mostraram a relação da ausência de FPR2 com o aumento da replicação viral de IAV. (ALESSI *et al.*, 2017; RAHMAN *et al.*, 2018). Em nosso estudo, as análises do título viral e da sobrevivência de animais WT e FPR2^{-/-} infectados foram prejudicadas devido à pandemia e à falta de animais gerada pela paralização das atividades da nossa universidade. Porém, reconhecemos a importância da realização dessas análises para melhor entender o papel de FPR2 no modelo de infecção por IAV.

Outros estudos analisaram parâmetros inflamatórios e a expressão de FPR2 em modelo de coinfeção. Em 2017, um estudo demonstrou que animais coinfectados com IAV e *Streptococcus pneumoniae* tiveram um aumento do recrutamento de neutrófilos, da atividade de elastase e de níveis de proteínas no BAL, assim como aumento dos níveis de MPO no tecido pulmonar. Esses parâmetros estavam associados ao aumento da expressão de FPR2 nos pulmões desses animais se comparado aos animais infectados somente com IAV. Entretanto, quando animais coinfectados foram tratados com um epímero de resolvina D1 (*aspirin-triggered resolvin D1* – At-RvD1), molécula que possui como um de seus ligantes o FPR2, houve uma diminuição no dano pulmonar, assim como na atividade de elastase, nos números de neutrófilos e monócitos no BAL e nos níveis de MPO tecidual. Entretanto, não foi demonstrado que a ação anti-inflamatória de At-RvD1 se deu por meio de FPR2 (WANG, HAO *et al.*, 2017). Em um outro estudo, Schloer *et al.* demonstraram o efeito protetivo da via de sinalização anexina A1/FPR2 em um modelo de infecção por influenza. Nesse estudo, animais que foram previamente tratados com anexina A1 e infectados com IAV PR8 apresentaram aumento da taxa de sobrevivência e diminuição dos níveis de IL-1 β , IL-6 e MCP-1 no 3º dia após infecção se comparado a animais não tratados. O tratamento também gerou a diminuição do dano pulmonar e aumento de macrófagos alveolares mediado pela via de sinalização de FPR2 (SCHLOER *et al.*, 2019). Nossos resultados também sugerem que FPR2 possui um papel protetivo em um modelo de infecção por IAV uma vez que animais FPR2^{-/-} apresentaram maior recrutamento de células para o BAL e maior dano pulmonar se comparado aos animais WT

Após analisarmos o papel de FPR2 na infecção por IAV, decidimos testar o efeito terapêutico da LXA₄ nesse modelo de infecção. Uma vez que estudos anteriores mostraram efeitos diversos de uma mesma molécula pró-resolutiva em modelos de inflamação crônica como fibrose pulmonar (RAGO *et al.*, 2019) e inflamação aguda como infecção por IAV (MELO *et al.*, 2021b), resolvemos testar o uso de benzo-LXA₄ como estratégia terapêutica na infecção por IAV ainda que essa molécula tenha se mostrado ineficaz quando usada como tratamento preventivo na fibrose pulmonar induzida por sílica.

Aqui demonstramos que a benzo-LXA₄ foi capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos para o BAL de animais tratados. Serhan *et al.* analisaram o efeito do tratamento de outros análogos de LXA₄ em neutrófilos e observaram que quando essas células foram tratadas com os análogos em estudo, o tratamento gerou uma diminuição na migração transepitelial dessas células assim como sua adesão em células endoteliais vasculares. Esses dados comprovam o potencial anti-inflamatório de análogos de LXA₄ (SERHAN, C N *et al.*, 1995). Além da redução

do recrutamento de neutrófilos, um outro processo importante para que haja a transição da fase inflamatória para a fase resolutiva da inflamação e o posterior retorno do tecido à homeostase é a ativação da apoptose de neutrófilos e a eferocitose dessas células por macrófagos M2 (SERHAN, CHARLES N *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2015). Demonstramos ainda, que o tratamento com benzo-LXA₄ aumenta tanto o número de células apoptóticas quanto o número de células eferocíticas. A ativação aumentada desses processos em animais tratados está relacionada ao aumento da sobrevivência desses animais assim como a diminuição do dano pulmonar causado pela infecção viral. Outros estudos demonstraram a relação do aumento da sobrevivência de animais infectados com a diminuição da polarização de macrófagos M1 e aumento de marcadores para M2. (CHIDA *et al.*, 2020; HALSTEAD *et al.*, 2018). Porém, não conseguimos observar polarização de macrófago, uma vez que o tratamento não alterou a expressão de iNOS e nem de CD206.

Estudo anterior também relacionou o aumento da expressão de LXA₄, de seu receptor e de enzimas de sua via (lipoxigenases 5, 12 e 15) à um cenário anti-inflamatório e pró-resolutivo. Camundongos foram instilados com bleomicina e tratados com células tronco (células epiteliais amnióticas humanas). O tratamento gerou aumento da expressão de LXA₄, de FPR2 e de lipoxigenases e foi relacionado ao aumento de níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-6. O tratamento também gerou diminuição de níveis de MPO tecidual e aumento de fagocitose por macrófagos derivados de medula (TAN *et al.*, 2017). Nossos resultados também mostram que LXA₄ é capaz contribuir para um cenário anti-inflamatório e pró-resolutivo em um contexto de infecção por IAV uma vez que é capaz de aumentar o potencial fagocítico de macrófagos, além de diminuir níveis de IFN γ no BAL dos animais tratados. Entretanto, devido à falta de animais gerada pela pandemia, não foi demonstrado aqui que a LXA₄ teria sua ação por meio de sua ligação com FPR2, usando, para isso, animais FPR2^{-/-} e tratados com benzo-LXA₄.

Além disso, nosso estudo mostra que benzo-LXA₄ possui um papel importante diminuindo o dano tecidual pulmonar de camundongos infectados com IAV. De fato, a ativação de uma das vias das lipoxinas tem como consequência o bloqueio da produção de ROS (SERHAN, CHARLES N *et al.*, 2020), molécula relacionada ao aumento do dano tecidual na infecção por IAV (LIU, HUI *et al.*, 2020). Além disso, corroborando com nossos resultados, em 2020, Wang *et al.* demonstraram que, em um modelo de dano pulmonar induzido por ventilação mecânica em ratos, quando os animais foram tratados com LXA₄ por via venosa, houve uma melhora na permeabilidade capilar desses animais e o dano pulmonar causado pela ventilação mecânica foi

significativamente reduzido (WANG, QI *et al.*, 2020). Esses resultados são de grande relevância já que pacientes com falência respiratória aguda induzida por influenza necessitam de suporte ventilatório e a ventilação em si pode exacerbar o dano pulmonar e aumentar a mortalidade desses pacientes (PIMENTA *et al.*, 2020).

Desse modo, nossos resultados sugerem que a LXA₄ apresenta um promissor potencial terapêutico no tratamento de infecção por Influenza A, minimizando o dano tecidual gerado pelo processo inflamatório induzido por esse microrganismo em virtude de seus efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos.

4.2.4 CONCLUSÃO

Esse estudo sugere que a intervenção farmacológica, via intraperitoneal, com o análogo de lipoxina A₄, benzo-lipoxina A₄, em camundongos, interfere na resposta inflamatória da infecção por Influenza A por meio da diminuição do recrutamento celular tanto para o tecido, quanto para as vias aéreas pulmonares, assim como a diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios por meio do aumento da apoptose de neutrófilos e sua eferocitose e diminuição do marcador para macrófagos M1 – iNOS-.

5 DISCUSSÃO GERAL

Mediadores pró-resolutivos são moléculas classicamente capazes de reduzir o recrutamento de neutrófilos; contra-regular a produção de mediadores pró-inflamatórios; induzir apoptose de neutrófilos e sua eferocitose por macrófagos alternativamente ativados, M2; induzir o retorno de células não apoptóticas para o sangue ou para o sistema linfático; regular o sistema imune adaptativo; estimular o reparo tecidual e induzir o retorno do tecido à homeostase, chamada “homeostase adaptada” (SUGIMOTO *et al.*, 2019b).

Ang-(1-7) é uma molécula ativa do sistema renina-angiotensina com propriedade anti-inflamatórias, anti-fibróticas e pró-resolutivas (GALVÃO *et al.*, 2019). Sabe-se que as células do sistema imune e células do epitélio pulmonar expressão tanto ACE2, enzima responsável pela conversão da Ang II em Ang-(1-7), quando o receptor Mas, receptor ao qual Ang-(1-7) se liga (SIMÕES E SILVA *et al.*, 2013), porém, pouco se sabe sobre a expressão endógena de ACE2, do receptor Mas e da produção de Ang-(1-7) na fibrose pulmonar (JIA, 2016). Aqui nós demonstramos o efeito preventivo e terapêutico do uso exógeno dessa molécula em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina. A Ang-(1-7), quando dada de maneira preventiva, apresentou efeitos anti-inflamatórios como diminuição do recrutamento de células para o BAL e para o tecido pulmonar; efeitos pró-resolutivos como aumento da apoptose de neutrófilos; e anti-fibróticos como diminuição da deposição de colágeno no tecido. Porém, quando testamos o efeito terapêutico dessa molécula nesse modelo observamos que, a medida que atrasamos o início do tratamento, o efeito benéfico da Ang-(1-7) foi perdido, se mostrando tempo-dependente (capítulo 1). Resolvemos então entender se os resultados obtidos com Ang-(1-7) seria comum com o uso de outro outro pró-resolutivo. Nesse momento, tivemos problemas na compra nacional de bleomicina, e a importação da mesma era inviável. Por isso, decidimos trocar o modelo de indução de fibrose com bleomicina pelo modelo de indução com sílica já previamente utilizado pelo nosso grupo (LIMA *et al.*, 2019). Testamos então o uso do análogo de LXA₄, benzo-LXA₄ na fibrose pulmonar induzida por sílica e percebemos que esse pró-resolutivo, quando dado de maneira terapêutica, também não apresentava efeitos benéficos nesse modelo (figura suplementar).

O tratamento prévio com benzo-LXA₄ já havia sido testado em um modelo de fibrose renal em ratos. Emma *et al.*, demonstraram que o tratamento causou a diminuição da deposição de colágeno no tecido, assim como, dos números de macrófagos recrutados (BÖRGESON *et al.*, 2011). Entretanto, quando testamos esse tratamento em um modelo de fibrose pulmonar

induzida por sílica em camundongos, os parâmetros analisados não foram diferentes quando comparamos os animais tratados e não tratados (figura suplementar).

Porém, pouco se sabe sobre o papel da LXA₄ e do seu receptor, FPR2, no modelo de fibrose pulmonar induzido por sílica. Em 2015, Trentin *et al.*, demonstraram o papel do peptídeo de Anexina A1, Ac-26, um outro pró-resolutivo que também se liga ao FPR2, em um modelo de silicose. Eles mostraram que quando fibroblastos pulmonares *knockout* para FPR2 eram tratados com o peptídeo Ac-26, o efeito anti-fibrótico observado em fibroblastos pulmonares WT era perdido. Com isso, eles concluíram que o bloqueio da produção de colágeno pelo tratamento com Ac-26 se deu por meio da sua ligação com FPR2 (TRENTIN *et al.*, 2015). Em contrapartida, um estudo de 2016 demonstrou o efeito da sílica em PMNs e monócitos tratados com agonistas de FPR2. Eles mostraram o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias por PMNs e monócitos estimulados com sílica e tratados com agonistas de FPR2. Assim, concluiu-se que PMNs e monócitos estimulados com sílica apresentaram uma resposta “inflamogênica” por meio da ativação de FPR2 (TAVANO *et al.*, 2016). Ainda, em um outro estudo, foi avaliado o efeito protetivo da apolipoproteína A1 (lipoproteína com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes) em um modelo de silicose *in vivo*. O estudo mostrou que camundongos transgênicos para apolipoproteína A1 que receberam sílica apresentaram menor deposição de colágeno nos pulmões assim como menores níveis de TGF- β e citocinas pró-inflamatórias se comparado a animais não transgênicos. Curiosamente, quando dosaram níveis de LXA₄, observaram que animais transgênicos para essa lipoproteína apresentaram aumento dos níveis desse pró-resolutivo nos pulmões podendo estar influenciando no cenário anti-inflamatório observado (LEE, EUN HEE *et al.*, 2013). Visto que estudos demonstram papéis diversos e opostos da LXA₄ e do seu receptor em modelos cujo estímulo é moléculas de sílica, faz-se necessário uma melhor investigação para entender o real papel desse pró-resolutivo e de seu receptor nesses modelos.

Apesar da necessidade de entender melhor o papel da LXA₄ e de seu receptor nos modelos de fibrose pulmonar, o prazo de entrega da tese estava curto e, devido à pandemia, a demanda de animais estava baixa. Portanto, decidimos testar o uso terapêutico dessa mesma molécula em um contexto de infecção por Influenza A, um modelo de doença inflamatória aguda, uma vez que um mesmo mediador pró-resolutivo pode apresentar efeitos diversos em diferentes doenças inflamatórias (MELO *et al.*, 2021a; RAGO *et al.*, 2019). De fato, os resultados obtidos foram promissores.

6 CONCLUSÃO GERAL

Mediadores pró-resolutivos são moléculas endógenas que apresentam papéis diversos em diferentes doenças inflamatórias, inclusive no contexto pulmonar. Nosso trabalho mostrou que o uso da angiotensina 1-7 quando usada de modo preventivo na fibrose pulmonar possui um efeito promissor, porém, esse efeito é perdido quando essa molécula é dada de maneira terapêutica. Por outro lado, em um outro trabalho, nosso grupo mostrou que essa mesma molécula possui um efeito terapêutico benéfico em um contexto de infecção por Influenza A. Esses resultados demonstram que uma mesma molécula pode apresentar efeitos diversos quando usados de forma terapêutica em doenças inflamatórias agudas e crônicas. Assim, uma vez que testamos outro pró-resolutivo, benzo-lipoxina A₄, como tratamento de fibrose pulmonar, com o objetivo de entender se outro pró-resolutivo também perderia o efeito terapêutico benéfico nesse modelo, e não observamos diferença nos parâmetros analisados entre os grupos estudados, resolvemos testar esse mesmo análogo em um contexto de doença inflamatória aguda, infecção por Influenza A. Vimos que, diferentemente dos resultados obtidos no modelo de fibrose, a benzo-lipoxina A₄ apresentou efeitos promissores como tratamento de infecção por esse vírus diminuindo a inflamação e aumentando os parâmetros pró-resolutivos avaliados. Portanto, demonstramos aqui que uma mesma molécula pode apresentar efeitos diversos quando dada de forma terapêutica em modelos experimentais diferentes, mostrando a importância de entender o papel de cada pró-resolutivo em cada modelo experimental.

7 MATERIAL SUPLEMENTAR

Após testar o tratamento com angiotensina 1-7 na fibrose pulmonar induzida por bleomicina, resolvemos testar outra molécula pró-resolutiva, a LXA₄, como medida terapêutica nesse modelo para entender se os resultados obtidos anteriormente eram comuns para outros pró-resolutivos. Porém, devido a dificuldade de acesso à bleomicina naquele período, resolvemos mudar para um modelo de fibrose pulmonar induzida por sílica já previamente usado pelo nosso grupo (LIMA *et al.*, 2019).

Os animais foram anestesiados e, então, instilados com 40ul de uma solução de 10mg/animal de sílica suspensa em salina e sempre bem homogeneizada antes do procedimento em cada animal. Animais controle foram instilados com o mesmo volume de salina, 40ul. O tratamento com benzo-LXA₄ (1,7ug/kg) foi iniciado uma hora antes da indução da fibrose com sílica, e mantido todos os dias, uma vez ao dia, i.p. Os animais foram eutanasiados nos dias 3, 7 e 14 após a indução da fibrose. A instilação com sílica gerou um aumento nos números de células totais (A) e nos níveis de mieloperoxidase (B) porém, não houve diminuição desses parâmetros nos grupos que receberam o tratamento prévio com benzo-LXA₄.

Como o tratamento não se mostrou eficiente já na fase inicial dos experimentos, resolvemos não dar prosseguimento às análises que explicariam tais resultados por elas demandarem um extenso período de tempo; tempo que não teríamos devido à pandemia e ao prazo para finalizar a tese. Com isso, decidimos mudar para um modelo de doença inflamatória aguda – infecção por Influenza A.

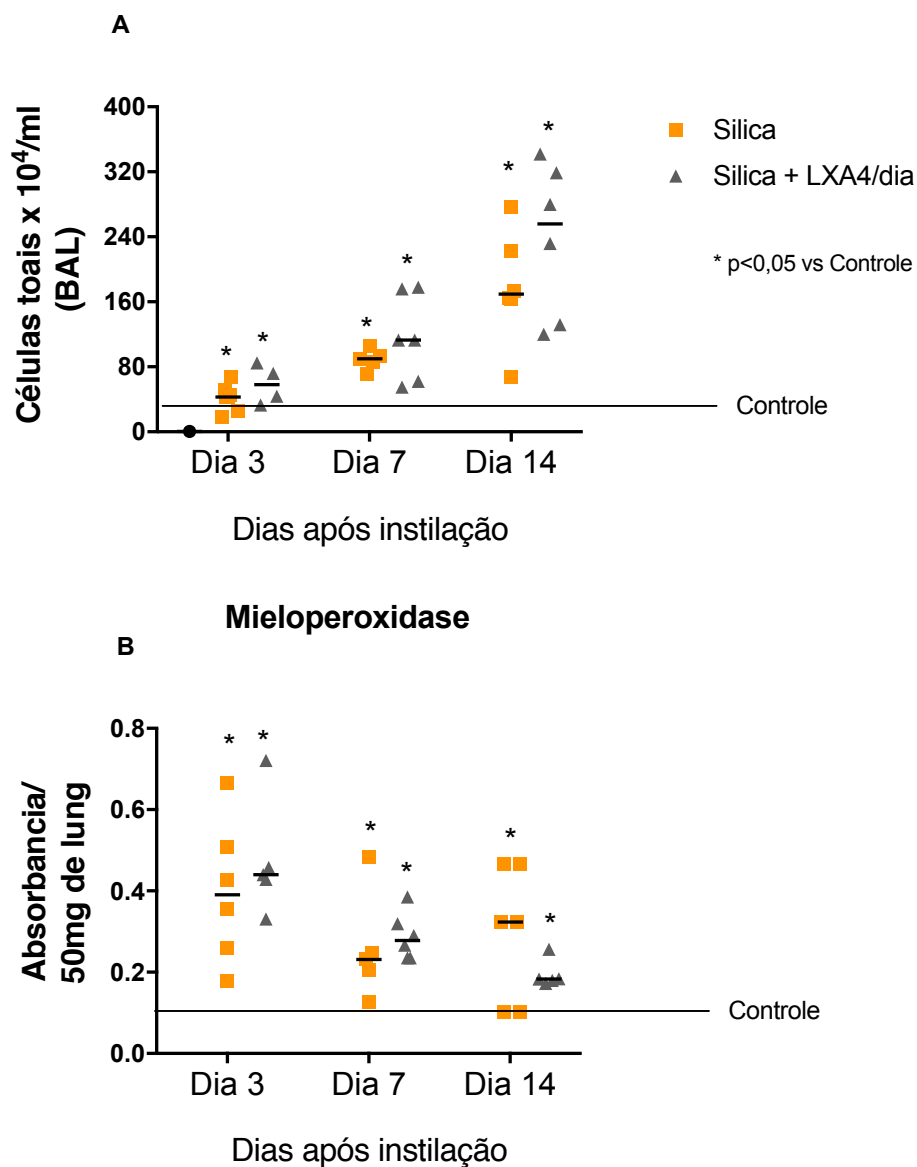


Figura 21. Avaliação do efeito do tratamento com o análogo de lipoxina A₄ na fibrose pulmonar induzida por sílica. Animais instilados com 10mg/animal de sílica tratados (triângulo cinza) e não tratados (quadrado amarelo) com 1,7 μ g/kg de benzo-lipoxina A₄ foram representados. Animais controles foram representados com um traço contínuo. Peso dos animais estudados (A). Análise celular do BAL com números de células totais (B), mononucleares (C) e neutrófilos (D). Valores expressos como média \pm EPM/mediana. Teste T seguido do teste de normalidade KS. Gráficos representativos de um experimento, onde $n = 4 - 7$. Os animais infectados foram comparados com seus respectivos controle (*= $p < 0,05$) ; #= $p < 0,05$.

REFERENCIAS

- A., M. K. *et al.* Possible contribution of nitric oxide and prostaglandin in the protective effect of angiotensin (1-7) against stress induced gastric ulceration in adult male albino rats. *Bratislava Medical Journal*, v. 117, n. 12, p. 715–721, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28127968>>. Acesso em: 1 fev. 2017.
- ADAMSON, I Y; BOWDEN, D H. Bleomycin-induced injury and metaplasia of alveolar type 2 cells. Relationship of cellular responses to drug presence in the lung. *The American journal of pathology*, v. 96, n. 2, p. 531–44, ago. 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/89815>>. Acesso em: 19 dez. 2016.
- ADAMSON, I Y; BOWDEN, D H. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 30, n. 1, p. 35–42, jan. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4812806>>. Acesso em: 31 jan. 2017.
- AHLUWALIA, Neil; SHEA, Barry S; TAGER, Andrew M. New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 190, n. 8, p. 867–78, 15 out. 2014. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201403-0509PP>>. Acesso em: 31 jan. 2017.
- AKDIS, Mübecel *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 127, n. 3, p. 701–721, 2011.
- AKIN, Levent; GÖZEL, Mustafa Gökhan. Understanding dynamics of pandemics. *Turkish journal of medical sciences*, v. 50, n. SI-1, p. 515–519, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32299204>>. Acesso em: 25 abr. 2021.
- ALESSI, Marie-Christine *et al.* FPR2: A Novel Promising Target for the Treatment of Influenza. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 1719, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28928730>>. Acesso em: 12 jun. 2021.
- ALTINTAS, Nejat *et al.* Protective Effect of Infliximab, a Tumor Necrosis Factor- α Inhibitor, on Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Rats. *Inflammation*, v. 39, n. 1, p. 65–78, 2016.
- AN, Yanan *et al.* Activation of ROS/MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 33, n. 11, p. 12515–12527, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31461386>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

ARTAUD-MACARI, Elise *et al.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation induces myofibroblastic dedifferentiation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*, v. 18, n. 1, p. 66–79, 1 jan. 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2011.4240>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

ASCOUGH, Stephanie; PATERSON, Suzanna; CHIU, Christopher. Induction and Subversion of Human Protective Immunity: Contrasting Influenza and Respiratory Syncytial Virus. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 323, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29552008>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

ASHCROFT, T; SIMPSON, J M; TIMBRELL, V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *Journal of clinical pathology*, v. 41, n. 4, p. 467–70, abr. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3366935>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

AYAUB, Ehab A. *et al.* Overexpression of OSM and IL-6 impacts the polarization of pro-fibrotic macrophages and the development of bleomycin-induced lung fibrosis. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 13281, 16 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29038604>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

AZAMBUJA, E. *et al.* Bleomycin lung toxicity: Who are the patients with increased risk? *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, v. 18, n. 5, p. 363–366, 2005.

BABAN, Babak *et al.* The role of GILZ in modulation of adaptive immunity in a murine model of myocardial infarction. *Experimental and molecular pathology*, v. 102, n. 3, p. 408–414, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28499885>>. Acesso em: 12 jul. 2021.

BACHELERIE, Françoise *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews*, v. 66, n. 1, p. 1–79, 2014.

BANNENBERG, Gerard; SERHAN, Charles N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1801, n. 12, p. 1260–1273, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708099>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

BAO, Jiaqi *et al.* Decreased Frequencies of Th17 and Tc17 Cells in Patients Infected with Avian Influenza A (H7N9) Virus. *Journal of immunology research*, v. 2019, p. 1418251, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31061831>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

BLANDINIÈRES, Adeline *et al.* Interleukin-8 release by endothelial colony-forming cells

isolated from idiopathic pulmonary fibrosis patients might contribute to their pathogenicity. *Angiogenesis*, 3 jan. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30607696>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

BOMHARD, Ernst M. Particle-induced Pulmonary Alveolar Proteinosis and Subsequent Inflammation and Fibrosis. *Toxicologic Pathology*, p. 019262331668895, 31 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28136187>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

BONNER, James C. Mesenchymal cell survival in airway and interstitial pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, v. 3, n. 1, p. 15, 25 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20738867>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

BÖRGESON, Emma *et al.* Lipoxin A₄ and benzo-lipoxin A₄ attenuate experimental renal fibrosis. *The FASEB Journal*, v. 25, n. 9, p. 2967–2979, set. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.11-185017>>. Acesso em: 28 maio 2021.

BORRIELLO, Francesco *et al.* GM-CSF and IL-3 Modulate Human Monocyte TNF- α Production and Renewal in In Vitro Models of Trained Immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 7, p. 680, 16 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28138327>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

BRENNAN, Eoin P. *et al.* Lipoxins Protect Against Inflammation in Diabetes-Associated Atherosclerosis. *Diabetes*, v. 67, n. 12, p. 2657–2667, dez. 2018a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30213823>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

BRENNAN, Eoin P *et al.* Lipoxins Protect Against Inflammation in Diabetes-Associated Atherosclerosis. *Diabetes*, v. 67, n. 12, p. 2657–2667, 2018b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30213823>>. Acesso em: 22 mar. 2021.

BRINKMANN, Volker *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, v. 303, n. 5663, p. 1532–5, 5 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

BUCZYNSKI, Matthew W *et al.* TLR-4 and sustained calcium agonists synergistically produce eicosanoids independent of protein synthesis in RAW264.7 cells. *The Journal of biological chemistry*, v. 282, n. 31, p. 22834–47, 3 ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17535806>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

BURGY, Olivier *et al.* Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity. *Science Transl. Med.*, v. 8, n. 326, p. 326ra20-326ra20, 2016. Disponível em: <<http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aad7785>>.

CAI, Guo-qiang *et al.* Downregulation of FAK-related non-kinase mediates the migratory

phenotype of human fibrotic lung fibroblasts. *Experimental cell research*, v. 316, n. 9, p. 1600–9, 15 maio 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482710000339>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

CAI, Ting *et al.* IL-17-producing ST2+ group 2 innate lymphoid cells play a pathogenic role in lung inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 143, n. 1, p. 229–244.e9, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29625134>>. Acesso em: 3 maio 2021.

CALZAS RODRIGUEZ, Julia; CARMEN JUAREZ MORALES, María Del; CASERO, Miguel Angel Racionero. Death by bleomycin pulmonary toxicity in ovarian dysgerminoma with pathologic complete response to chemotherapy. A case report. *Respiratory Medicine Case Reports*, v. 18, p. 48–50, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmcr.2016.04.004>>.

CARDING, S R *et al.* Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 172, n. 4, p. 1225–31, 1 out. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2145388>>. Acesso em: 2 maio 2021.

CARNESECCHI, Stephanie *et al.* A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*, v. 15, n. 3, p. 607–19, 1 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3829>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

CHAN, Louisa L Y *et al.* Host DNA released by NETosis in neutrophils exposed to seasonal H1N1 and highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Respiratory research*, v. 21, n. 1, p. 160, 23 jun. 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32576265>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

CHEN, Ji *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 priming enhances the function of endothelial progenitor cells and their therapeutic efficacy. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, v. 61, n. 3, p. 681–9, 1 mar. 2013. Disponível em: <<http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00202>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

CHERPOKOVA, Deya *et al.* Resolvin D4 attenuates the severity of pathological thrombosis in mice. *Blood*, v. 134, n. 17, p. 1458, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6839959/>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

CHIANG, Nan *et al.* Maresin 1 activates LGR6 receptor promoting phagocyte immunoresolvent functions. *The Journal of clinical investigation*, v. 129, n. 12, p. 5294–5311,

2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31657786>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

CHIANG, Nan; SERHAN, Charles N. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Molecular aspects of medicine*, v. 58, p. 114–129, dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28336292>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CHIDA, Junji *et al.* Prion protein signaling induces M2 macrophage polarization and protects from lethal influenza infection in mice. *PLoS pathogens*, v. 16, n. 8, p. e1008823, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32845931>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

CHIURCHIÙ, Valerio *et al.* Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Science translational medicine*, v. 8, n. 353, p. 353ra111, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27559094>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

COLE, Suzanne L *et al.* M1-like monocytes are a major immunological determinant of severity in previously healthy adults with life-threatening influenza. *JCI insight*, v. 2, n. 7, p. e91868, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28405622>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

COOK, Katherine L *et al.* Angiotensin-(1-7) reduces fibrosis in orthotopic breast tumors. *Cancer research*, v. 70, n. 21, p. 8319–28, 1 nov. 2010. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-1136>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

COURTIN, Noémie *et al.* Antiviral activity of formyl peptide receptor 2 antagonists against influenza viruses. *Antiviral Research*, v. 143, p. 252–261, jul. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354216307938>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

COVVEY, Jordan R.; MANCL, Erin E. Recent Evidence for Pharmacological Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 48, n. 12, p. 1611–1619, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202034>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

D, Panigrahy *et al.* Inflammation resolution: a dual-pronged approach to averting cytokine storms in COVID-19? *Cancer metastasis reviews*, v. 39, n. 2, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32385712/>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

DAI, Songjuan *et al.* Lipoxin A₄ Suppresses IL-1 β -Induced Cyclooxygenase-2 Expression Through Inhibition of p38 MAPK Activation in Endometriosis. *Reproductive Sciences*, p. 193371911982811, 17 fev. 2019a. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30773096>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

DAI, Songjuan *et al.* Lipoxin A4 Suppresses IL-1 β -Induced Cyclooxygenase-2 Expression Through Inhibition of p38 MAPK Activation in Endometriosis. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, v. 26, n. 12, p. 1640–1649, 2019b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30773096>>. Acesso em: 16 jul. 2021.

DALLI, Jesmond; SERHAN, Charles N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*, v. 120, n. 15, p. e60-72, 11 out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22904297>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

DATTA, Arnab; SCOTTON, Chris J; CHAMBERS, Rachel C. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis. *British Journal of Pharmacology*, v. 163, n. 1, p. 141–172, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21265830>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

DE CARVALHO SANTUCHI, Melissa *et al.* Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages In Vitro and In Vivo. *Mediators of inflammation*, v. 2019, p. 2401081, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30918468>>. Acesso em: 2 jul. 2021.

DE LENA, M *et al.* Clinical, radiologic, and histopathologic studies on pulmonary toxicity induced by treatment with bleomycin (NSC-125066). *Cancer chemotherapy reports*, v. 56, n. 3, p. 343–56, jun. 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19051494>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

DELLA LATTI, Veronica *et al.* Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacological Research*, v. 97, p. 122–130, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.04.012>>.

DUAN, Susu *et al.* Diverse heterologous primary infections radically alter immunodominance hierarchies and clinical outcomes following H7N9 influenza challenge in mice. *PLoS pathogens*, v. 11, n. 2, p. e1004642, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25668410>>. Acesso em: 2 maio 2021.

DURU, Nadire; WOLFSON, Benjamin; ZHOU, Qun. Mechanisms of the alternative activation of macrophages and non-coding RNAs in the development of radiation-induced lung fibrosis. *World journal of biological chemistry*, v. 7, n. 4, p. 231–239, 26 nov. 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v7/i4/231.htm>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

EDINGER, Thomas O; POHL, Marie O; STERTZ, Silke. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *The Journal of general virology*, v. 95, n. Pt 2, p. 263–277, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24225499>>. Acesso em: 24 abr.

2021.

F, Rago *et al.* Effect of Preventive or Therapeutic Treatment With Angiotensin 1-7 in a Model of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *Journal of leukocyte biology*, v. 106, n. 3, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31256436/>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

FROUDARAKIS, Marios *et al.* Revisiting bleomycin from pathophysiology to safe clinical use. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 87, n. 1, p. 90–100, jul. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842812002491>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

GALVÃO, Izabela *et al.* Angiotensin 1-7 and Inflammation. *Angiotensin-(1-7)*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 201–218. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-22696-1_13>. Acesso em: 27 jul. 2021.

GALVÃO, Izabela *et al.* Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. *European journal of immunology*, v. 47, n. 3, p. 585–596, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995621>>. Acesso em: 5 maio 2021.

GALVÃO, Izabela *et al.* Therapeutic potential of the FPR2/ALX agonist AT-01-KG in the resolution of articular inflammation. *Pharmacological research*, v. 165, p. 105445, mar. 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33493655>>. Acesso em: 22 mar. 2021.

GAO, Yuan *et al.* Dietary DHA amplifies LXA4 circuits in tissues and lymph node PMN and is protective in immune-driven dry eye disease. *Mucosal immunology*, v. 11, n. 6, p. 1674–1683, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30104626>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

GARCIA, Cristiana C *et al.* Complement C5 activation during influenza A infection in mice contributes to neutrophil recruitment and lung injury. *PloS one*, v. 8, n. 5, p. e64443, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696894>>. Acesso em: 6 maio 2021.

GARCIA, Cristiana C *et al.* Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice. *PLoS pathogens*, v. 6, n. 11, p. e1001171, 4 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079759>>. Acesso em: 28 maio 2021.

GEORGE, Peter M; WELLS, Athol U; JENKINS, R Gisli. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. *The Lancet. Respiratory medicine*, v. 8, n. 8, p. 807–815, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32422178>>. Acesso em: 2 ago. 2021.

GHONEIM, Hazem E; THOMAS, Paul G; MCCULLERS, Jonathan A. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 191, n. 3, p. 1250–9, 1 ago. 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804714>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

GILL, Michelle A *et al.* Enhanced plasmacytoid dendritic cell antiviral responses after omalizumab. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 141, n. 5, p. 1735- 1743.e9, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870461>>. Acesso em: 2 maio 2021.

GJ, Kang; EJ, Kim; CH, Lee. Therapeutic Effects of Specialized Pro-Resolving Lipids Mediators on Cardiac Fibrosis via NRF2 Activation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, v. 9, n. 12, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33321955/>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

GL, Negreiros-Lima *et al.* Cyclic AMP Regulates Key Features of Macrophages via PKA: Recruitment, Reprogramming and Efferocytosis. *Cells*, v. 9, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31935860/>>. Acesso em: 12 jul. 2021.

GOODWIN, Amanda; JENKINS, Gisli. Role of integrin-mediated TGF β activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochemical Society Transactions*, v. 37, n. 4, p. 849–854, 1 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19614606>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

GORDON, Siamon; MARTINEZ, Fernando O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*, v. 32, n. 5, p. 593–604, 28 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510870>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

GORSKI, Stacey Ann; HAHN, Young S; BRACIALE, Thomas J. Group 2 innate lymphoid cell production of IL-5 is regulated by NKT cells during influenza virus infection. *PLoS pathogens*, v. 9, n. 9, p. e1003615, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068930>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

GRABIEC, Aleksander M; HUSSELL, Tracy. The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. *Seminars in immunopathology*, v. 38, n. 4, p. 409–23, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26957481>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

GREGORY, Alyssa D *et al.* Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *Journal of leukocyte biology*, v. 98, n. 2, p. 143–52, ago. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.3HI1014-493R>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

GROUSD, Jennifer A; RICH, Helen E; ALCORN, John F. Host-Pathogen Interactions in Gram-Positive Bacterial Pneumonia. *Clinical microbiology reviews*, v. 32, n. 3, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31142498>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

GSCHWANDTNER, Martha *et al.* Glycosaminoglycans are important mediators of

neutrophilic inflammation in vivo. *Cytokine*, v. 91, p. 65–73, mar. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466616305993>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

GUILLOT, Loïc *et al.* Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *The Journal of biological chemistry*, v. 280, n. 7, p. 5571–80, 18 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579900>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

GUILLOT, Loïc *et al.* Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *The Journal of biological chemistry*, v. 279, n. 4, p. 2712–8, 23 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14600154>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

GUO, Yan-Ping *et al.* Lipoxin A4 may attenuate the progression of obesity-related glomerulopathy by inhibiting NF- κ B and ERK/p38 MAPK-dependent inflammation. *Life sciences*, v. 198, p. 112–118, 1 abr. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29499280>>. Acesso em: 15 jul. 2021.

GUO, Zongduo *et al.* Lipoxin A4 Reduces Inflammation Through Formyl Peptide Receptor 2/p38 MAPK Signaling Pathway in Subarachnoid Hemorrhage Rats. *Stroke*, v. 47, n. 2, p. 490–7, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26732571>>. Acesso em: 16 jul. 2021.

GURCZYNSKI, Stephen J *et al.* CCR2 mediates increased susceptibility to post-H1N1 bacterial pneumonia by limiting dendritic cell induction of IL-17. *Mucosal immunology*, v. 12, n. 2, p. 518–530, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30498200>>. Acesso em: 6 maio 2021.

H, Luan *et al.* Resolvin D1 Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury by Increasing Treg Percentages via the ALX/FPR2 Pathway. *Frontiers in physiology*, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32317985/>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

HALSTEAD, E Scott *et al.* GM-CSF overexpression after influenza a virus infection prevents mortality and moderates M1-like airway monocyte/macrophage polarization. *Respiratory research*, v. 19, n. 1, p. 3, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29304863>>. Acesso em: 23 abr. 2021.

HAWKINS, Kimberly E *et al.* Targeting resolution of neuroinflammation after ischemic stroke with a lipoxin A4 analog: Protective mechanisms and long-term effects on neurological recovery. *Brain and behavior*, v. 7, n. 5, p. e00688, 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28523230>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

HAY, J G *et al.* Development of acute lung injury after the combination of intravenous bleomycin and exposure to hyperoxia in rats. *Thorax*, v. 42, n. 5, p. 374–82, maio 1987.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2443992>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

HAY, John; SHAHZEIDI, Shahriar; LAURENT, Geoffrey. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Archives of Toxicology*, v. 65, n. 2, p. 81–94, 1991.

HILLAIRE, M L B; RIMMELZWAAN, G F; KREIJTZ, J H C M. Clearance of influenza virus infections by T cells: risk of collateral damage? *Current opinion in virology*, v. 3, n. 4, p. 430–7, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721864>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

HOLT, P G; SCHON-HEGRAD, M A. Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. *Immunology*, v. 62, n. 3, p. 349–56, nov. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3499375>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

HOSHINO, Tomoaki *et al.* Role of Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1 β in Bleomycin-Induced Lung Injury in Humans and Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 41, n. 6, p. 661–670, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2008-0182OC>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

HU, X H *et al.* Lipoxin A4 alleviates lung injury in sepsis rats through p38/MAPK signaling pathway. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, v. 34, n. 3, p. 807–814, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32657110>>. Acesso em: 15 jul. 2021.

HUO, Caiyun *et al.* Lethal influenza A virus preferentially activates TLR3 and triggers a severe inflammatory response. *Virus research*, v. 257, p. 102–112, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30248373>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

HUTCHINSON, Edward C. Influenza Virus. *Trends in microbiology*, v. 26, n. 9, p. 809–810, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29909041>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

HUTCHINSON, Edward C; FODOR, Ervin. Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses*, v. 5, n. 10, p. 2424–46, 2 out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24104053>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

IBRICEVIC, Aida *et al.* Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *Journal of virology*, v. 80, n. 15, p. 7469–80, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840327>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 161, n. 2, p. 646–664, fev. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673212>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

IMAI, Yumiko *et al.* Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*, v. 133, n. 2, p. 235–49, 18 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423196>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

JANG, Hyesun; ROSS, Ted M. Preexisting influenza specific immunity and vaccine effectiveness. *Expert review of vaccines*, v. 18, n. 10, p. 1043–1051, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31575308>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

JIA, Hongpeng. Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and Inflammatory Lung Disease. *Shock*, v. 46, n. 3, p. 239–248, set. 2016. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00024382-201609000-00003>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

JOHNSON, Susan *et al.* Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells. *Immunity*, v. 30, n. 2, p. 218–27, 20 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200758>>. Acesso em: 2 maio 2021.

JULKUNEN, Ilkka *et al.* Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine*, v. 19, p. S32–S37, dez. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X00002759>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

KALIL, Andre C; THOMAS, Paul G. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Critical care (London, England)*, v. 23, n. 1, p. 258, 2019a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31324202>>. Acesso em: 22 mar. 2021.

KALIL, Andre C; THOMAS, Paul G. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Critical care (London, England)*, v. 23, n. 1, p. 258, 2019b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31324202>>. Acesso em: 28 maio 2020.

KANDASAMY, Matheswaran *et al.* Suppression of Cytotoxic T Cell Functions and Decreased Levels of Tissue-Resident Memory T Cells during H5N1 Infection. *Journal of virology*, v. 94, n. 9, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32075925>>. Acesso em: 2 maio 2021.

KEIJZER, A.; KUENEN, B. Fatal Pulmonary Toxicity in Testis Cancer With Bleomycin-Containing Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 23, p. 3543–3544, 2 jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687159>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

KIM, Hyunjung *et al.* LXA4-FPR2 signaling regulates radiation-induced pulmonary fibrosis

via crosstalk with TGF- β /Smad signaling. *Cell Death & Disease*, v. 11, n. 8, p. 653, 8 ago. 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32811815>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

KRAMMER, Florian *et al.* Influenza. *Nature reviews. Disease primers*, v. 4, n. 1, p. 3, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29955068>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

KREUTZ, R *et al.* Effect of losartan on right ventricular hypertrophy and cardiac angiotensin I-converting enzyme activity in pulmonary hypertensive rats. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y.: 1993)*, v. 18, n. 1, p. 101–11, jan. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822237>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

KRISHNA, Rachana; CHAPMAN, Kyle; ULLAH, Saad. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. [S.l.]: StatPearls Publishing, 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846333>>. Acesso em: 6 maio 2021.

KUHN, C. Ultrastructure and cellular function in the distal lung. *Monographs in pathology*, v. 19, p. 1–20, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/218096>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

KUWANO, Kazuyoshi *et al.* Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 104, n. 1, p. 13–19, 1 jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393694>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

LAMICHHANE, Prem P; SAMARASINGHE, Amali E. The Role of Innate Leukocytes during Influenza Virus Infection. *Journal of immunology research*, v. 2019, p. 8028725, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31612153>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

LC, Barroso *et al.* Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Neutrophilic Inflammation in a Model of Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Frontiers in immunology*, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29209329/>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

LE GOFFIC, Ronan *et al.* Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS pathogens*, v. 2, n. 6, p. e53, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789835>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

LEE, Eun hee *et al.* Overexpression of apolipoprotein A1 in the lung abrogates fibrosis in experimental silicosis. *PloS one*, v. 8, n. 2, p. e55827, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409054>>. Acesso em: 8 jun. 2021.

LEE, Ye Ji *et al.* Apoptotic cell instillation after bleomycin attenuates lung injury through hepatocyte growth factor induction. *European Respiratory Journal*, v. 40, n. 2, p. 424–435, 2012.

LEHMANN, C *et al.* Infection of macrophages by influenza A virus: characteristics of tumour

necrosis factor-alpha (TNF alpha) gene expression. *Research in virology*, v. 147, n. 2–3, p. 123–30, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901431>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

LI, Guanqun *et al.* Macrophage-secreted TSLP and MMP9 promote bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 366, p. 10–16, 14 mar. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30653976>>. Acesso em: 5 fev. 2019.

LI, Ke; MCCAWE, James M.; CAO, Pengxing. Modelling within-host macrophage dynamics in influenza virus infection. *Journal of Theoretical Biology*, v. 508, p. 110492, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519320303477>>. Acesso em: 9 abr. 2021.

LI, Yuhua *et al.* Lipoxin A4 protects against paraquat-induced acute lung injury by inhibiting the TLR4/MyD88-mediated activation of the NF- κ B and PI3K/AKT pathways. *International journal of molecular medicine*, v. 47, n. 5, maio 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33760150>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

LI, Zhuofan *et al.* Adjuvantation of Influenza Vaccines to Induce Cross-Protective Immunity. *Vaccines*, v. 9, n. 2, 21 jan. 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33494477>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

LIM, Hye Kyung *et al.* Severe influenza pneumonitis in children with inherited TLR3 deficiency. *The Journal of experimental medicine*, v. 216, n. 9, p. 2038–2056, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31217193>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

LIM, Kihong *et al.* In situ neutrophil efferocytosis shapes T cell immunity to influenza infection. *Nature immunology*, v. 21, n. 9, p. 1046–1057, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32747818>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

LIM, Kihong *et al.* Neutrophil trails guide influenza-specific CD8⁺ T cells in the airways. *Science (New York, N.Y.)*, v. 349, n. 6252, p. aaa4352, 4 set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339033>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

LIMA, Braulio Henrique Freire *et al.* Converging TLR9 and PI3Kgamma signaling induces sterile inflammation and organ damage. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 19085, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31836766>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

LIU, Huaizheng *et al.* Lipoxin A4 receptor agonist BML-111 induces autophagy in alveolar macrophages and protects from acute lung injury by activating MAPK signaling. *RESPIRATORY RESEARCH*, v. 19, n. 1, p. 243, 5 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30518355>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

LIU, Hui *et al.* Berberine suppresses influenza virus-triggered NLRP3 inflammasome activation in macrophages by inducing mitophagy and decreasing mitochondrial ROS. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 108, n. 1, p. 253–266, 9 jul. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JLB.3MA0320-358RR>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

LIU, Yi-Min; NEPALI, Kunal; LIOU, Jing-Ping. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Current Status, Recent Progress, and Emerging Targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, n. 2, p. 527–553, 26 jan. 2017. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.6b00935>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

LIU, Zhaohui *et al.* Lipoxin A4 ameliorates renal ischaemia–reperfusion-induced acute lung injury in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 46, n. 1, p. 65–74, 6 jan. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30118542>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

LODYGA, Monika; HINZ, Boris. TGF- β 1 – A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31879265>>. Acesso em: 3 mar. 2020.

LOMAS, Nicola J *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 5, n. 1, p. 58–71, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22295148>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

LU, W. *et al.* Angiotensin-(1-7) relieved renal injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats by reducing inflammation, oxidative stress and fibrosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 50, n. 1, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2017000100604&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 1 fev. 2017.

LUO, Yan-Yan *et al.* Lipoxin A4 attenuates hyperoxia-induced lung epithelial cell injury via the upregulation of heme oxygenase-1 and inhibition of proinflammatory cytokines. *Molecular medicine reports*, v. 21, n. 1, p. 429–437, jan. 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31746387>>. Acesso em: 16 jul. 2021.

LUURSEMA, P B *et al.* Bleomycin-induced changes in the carbon monoxide transfer factor of the lungs and its components. *The American review of respiratory disease*, v. 128, n. 5, p. 880–3, nov. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6195947>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

MA, Xinhua *et al.* Angiotensin-(1-7)/Mas Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced ADAM17 Shedding Activity and Apoptosis in Alveolar Epithelial Cells. *Pharmacology*, v. 97, n. 1–2, p. 63–71, 8 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/441606>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

MACHADO, Marina Gomes *et al.* The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 34, n. 2, p. 2749–2764, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31908042>>. Acesso em: 5 maio 2021.

MAGALHAES, Giselle S *et al.* Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 58, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29434591>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

MAHER, Toby; ADAMALI, Toby M. Current and novel drug therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 6, p. 261, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055696>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

MAROOF, Asher *et al.* Intranasal vaccination promotes detrimental Th17-mediated immunity against influenza infection. *PLoS pathogens*, v. 10, n. 1, p. e1003875, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24465206>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

MARQUES, Raquel M *et al.* Loss of 15-lipoxygenase disrupts Treg differentiation altering their pro-resolving functions. *Cell death and differentiation*, 27 maio 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34040168>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

MAYADAS, Tanya N.; CULLERE, Xavier; LOWELL, Clifford A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 9, n. 1, p. 181–218, 24 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050624>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

MCCULLERS, Jonathan A. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 252–262, 3 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro3231>>. Acesso em: 6 maio 2021.

MELO, Eliza M *et al.* Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus and post-influenza pneumococcal infection. *Pharmacological research*, v. 163, p. 105292, 2021a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33171305>>. Acesso em: 5 maio 2021.

MELO, Eliza M *et al.* Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus and post-influenza pneumococcal infection. *Pharmacological research*, v.

163, p. 105292, jan. 2021b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33171305>>. Acesso em: 23 fev. 2021.

MELO, Eliza M *et al.* Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus and post-influenza pneumococcal infection. *Pharmacological research*, v. 163, p. 105292, jan. 2021c. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33171305>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

MG, Machado *et al.* The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 34, n. 2, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31908042/>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

MONICK, Martha M *et al.* Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *The Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 52, p. 53035–44, 26 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14565959>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

MONTICELLI, Laurel A *et al.* Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nature immunology*, v. 12, n. 11, p. 1045–54, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946417>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

MOORE, Bethany B.; HOGABOAM, Cory M. Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 294, n. 2, 2008.

MORITA, Rimpei *et al.* Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*, v. 34, n. 1, p. 108–21, 28 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215658>>. Acesso em: 2 maio 2021.

MOURATIS, Marios A.; AIDINIS, Vassilis. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 17, n. 5, p. 355–361, set. 2011. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00063198-201109000-00011>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

MURPHY, P M *et al.* International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews*, v. 52, n. 1, p. 145–176, 2000.

NARASARAJU, Teluguakula *et al.* Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *The American journal of pathology*, v. 179, n. 1, p. 199–210, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703402>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

NOGUSA, Shoko *et al.* RIPK3 Activates Parallel Pathways of MLKL-Driven Necroptosis and

FADD-Mediated Apoptosis to Protect against Influenza A Virus. *Cell host & microbe*, v. 20, n. 1, p. 13–24, 13 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27321907>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

NÜSSING, Simone *et al.* Innate and adaptive T cells in influenza disease. *Frontiers of Medicine*, v. 12, n. 1, p. 34–47, 20 fev. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11684-017-0606-8>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

OJO, Ademola S *et al.* Pulmonary Fibrosis in COVID-19 Survivors: Predictive Factors and Risk Reduction Strategies. *Pulmonary medicine*, v. 2020, p. 6175964, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32850151>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PÁDUA, Tatiana A. *et al.* Therapeutic effect of Lipoxin A₄ in malaria-induced acute lung injury. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 103, n. 4, p. 657–670, abr. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29345368>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

PANDOLFI, F *et al.* The Importance of Complying with Vaccination Protocols in Developed Countries: “Anti-Vax” Hysteria and the Spread of Severe Preventable Diseases. *Current medicinal chemistry*, v. 25, n. 42, p. 6070–6081, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29773050>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

PASSOS-SILVA, Danielle Gomes; BRANDAN, Enrique; SANTOS, Robson Augusto Souza. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends in pharmacological sciences*, v. 36, n. 5, p. 310–20, maio 2015a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614715000413>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

PASSOS-SILVA, Danielle Gomes; BRANDAN, Enrique; SANTOS, Robson Augusto Souza. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 36, n. 5, p. 310–320, maio 2015b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614715000413>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

PERNET, Erwan *et al.* Leukotriene B₄-type I interferon axis regulates macrophage-mediated disease tolerance to influenza infection. *Nature microbiology*, v. 4, n. 8, p. 1389–1400, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31110361>>. Acesso em: 3 maio 2021.

PETREK, M *et al.* The source and role of RANTES in interstitial lung disease. *European Respiratory Journal*, v. 10, n. 6, 1997.

PIGUET, P F *et al.* Expression and localization of tumor necrosis factor- α and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, v. 143, n. 3, p. 651–5, set. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8362967>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

PIMENTA, Letícia Brito Mendes *et al.* Protective mechanical ventilation in suspected influenza

infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 53, p. e20190481, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33027412>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

PIROTH, Lionel *et al.* Comparison of the characteristics, morbidity, and mortality of COVID-19 and seasonal influenza: a nationwide, population-based retrospective cohort study. *The Lancet. Respiratory medicine*, v. 9, n. 3, p. 251–259, 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33341155>>. Acesso em: 5 maio 2021.

POLAND, Gregory A. Influenza vaccine failure: failure to protect or failure to understand? *Expert review of vaccines*, v. 17, n. 6, p. 495–502, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29883218>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

QUECK, Alexander *et al.* Alox12/15 Deficiency Exacerbates, While Lipoxin A4 Ameliorates Hepatic Inflammation in Murine Alcoholic Hepatitis. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 1447, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32760397>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

RAGO, Flávia *et al.* Effect of preventive or therapeutic treatment with angiotensin 1-7 in a model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Journal of leukocyte biology*, v. 106, n. 3, p. 677–686, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31256436>>. Acesso em: 22 mar. 2021.

RAHMAN, Fryad *et al.* The Annexin A1 Receptor FPR2 Regulates the Endosomal Export of Influenza Virus. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 5, 8 maio 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29738458>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

RAMON, Sesquile *et al.* Lipoxin A₄ modulates adaptive immunity by decreasing memory B-cell responses via an ALX/FPR2-dependent mechanism. *European journal of immunology*, v. 44, n. 2, p. 357–69, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24166736>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

REISER, K M *et al.* Changes in collagen cross-linking in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Journal of biochemical toxicology*, v. 1, n. 1, p. 83–91, mar. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2482891>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

REN, Rongrong *et al.* The H7N9 influenza A virus infection results in lethal inflammation in the mammalian host via the NLRP3-caspase-1 inflammasome. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 7625, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28790324>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

ROACH, Katy M *et al.* Lipoxin A4 Attenuates Constitutive and TGF- β 1-Dependent Profibrotic Activity in Human Lung Myofibroblasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v.

195, n. 6, p. 2852–60, 15 set. 2015. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1500936>>. Acesso em: 13 dez. 2018.

ROSEN, Daniel G *et al.* Postmortem findings in eight cases of influenza A/H1N1. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, v. 23, n. 11, p. 1449–57, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802471>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

ROSSI, Santiago E. *et al.* Pulmonary Drug Toxicity: Radiologic and Pathologic Manifestations. *RadioGraphics*, v. 20, n. 5, p. 1245–1259, set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992015>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

RUDEMILLER, Nathan P. *et al.* C-C Motif Chemokine 5 Attenuates Angiotensin II-Dependent Kidney Injury by Limiting Renal Macrophage Infiltration. *The American Journal of Pathology*, v. 186, n. 11, p. 2846–2856, nov. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944016302954>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

RUIZ, F.; VIGNE, S.; POT, C. Resolution of inflammation during multiple sclerosis. *Seminars in Immunopathology*, v. 41, n. 6, p. 711, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6881249/>>. Acesso em: 1 jul. 2021.

RUSSO, Remo C. *et al.* Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 40, n. 4, p. 410–421, 2009.

RUSSO, Remo C. *et al.* Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 45, n. 1, p. 72–80, 2011.

RYMUT, Nicholas *et al.* Resolvin D1 promotes efferocytosis in aging by limiting senescent cell-induced MerTK cleavage. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 34, n. 1, p. 597–609, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31914705>>. Acesso em: 6 jul. 2021.

SAITO, Fumitake *et al.* Role of Interleukin-6 in Bleomycin-Induced Lung Inflammatory Changes in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 38, n. 5, p. 566–571, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096870>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

SANDERS, Catherine J *et al.* Compromised respiratory function in lethal influenza infection is characterized by the depletion of type I alveolar epithelial cells beyond threshold levels.

American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, v. 304, n. 7, p. L481-8, 1 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355384>>. Acesso em: 29 maio 2020.

SANO, Kaori *et al.* The road to a more effective influenza vaccine: Up to date studies and future prospects. *Vaccine*, v. 35, n. 40, p. 5388–5395, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28866292>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

SASTRE, Beatriz *et al.* Bronchiolitis and recurrent wheezing are distinguished by type 2 innate lymphoid cells and immune response. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, v. 32, n. 1, p. 51–59, jan. 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32628310>>. Acesso em: 3 maio 2021.

SCHEULE, R K *et al.* Bleomycin stimulation of cytokine secretion by the human alveolar macrophage. *The American journal of physiology*, v. 262, n. 4 Pt 1, p. L386-91, abr. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373569>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

SCHLOER, Sebastian *et al.* The annexin A1/FPR2 signaling axis expands alveolar macrophages, limits viral replication, and attenuates pathogenesis in the murine influenza A virus infection model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 33, n. 11, p. 12188–12199, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31398292>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

SCHMIDT, Reinhold *et al.* Changes in pulmonary surfactant function and composition in bleomycin-induced pneumonitis and fibrosis. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 195, n. 2, p. 218–31, 1 mar. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X03005416>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The inflammasomes. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 821–32, 19 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303873>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

SEKHERI, Meriem *et al.* 15-Epi-LXA4 and 17-epi-RvD1 restore TLR9-mediated impaired neutrophil phagocytosis and accelerate resolution of lung inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 14, p. 7971–7980, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32205444>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

SERHAN, C N *et al.* Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*, v. 34, n. 44, p. 14609–15, 7 nov. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7578068>>. Acesso em: 7 jun. 2021.

SERHAN, Charles N *et al.* Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 2, p. a016311, 30 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359497>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

SERHAN, Charles N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *The American journal of pathology*, v. 177, n. 4, p. 1576–91, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813960>>. Acesso em: 3 maio 2021.

SERHAN, Charles N *et al.* The Atlas of Inflammation Resolution (AIR). *Molecular aspects of medicine*, v. 74, p. 100894, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32893032>>. Acesso em: 7 jun. 2021.

SERHAN, Charles N; LEVY, Bruce D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *The Journal of clinical investigation*, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 2018a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29757195>>. Acesso em: 3 maio 2021.

SERHAN, Charles N; LEVY, Bruce D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *The Journal of clinical investigation*, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 2018b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29757195>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

SERHAN, Charles N; SAVILL, John. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, v. 6, n. 12, p. 1191–7, 1 dez. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni1276>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

SERHAN, Charles N; YACOUBIAN, Stephanie; YANG, Rong. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annual review of pathology*, v. 3, p. 279–312, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18233953>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

SERTL, K *et al.* Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *The Journal of experimental medicine*, v. 163, n. 2, p. 436–51, 1 fev. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3511172>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

SHIM, Jung Min *et al.* Influenza Virus Infection, Interferon Response, Viral Counter-Response, and Apoptosis. *Viruses*, v. 9, n. 8, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28805681>>. Acesso em: 2 maio 2021.

SHORT, Kirsty R *et al.* Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, p. 57–69, jan. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147330991370286X>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

SIMÕES E SILVA, A C *et al.* ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation

and fibrosis. *British journal of pharmacology*, v. 169, n. 3, p. 477–92, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23488800>>. Acesso em: 3 abr. 2021.

SKIBA, DS *et al.* Antiatherosclerotic effect of Ang- (1-7) non-peptide mimetic (AVE 0991) is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 9 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27935022>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

SON, Young Min *et al.* Tissue-resident CD4+ T helper cells assist the development of protective respiratory B and CD8+ T cell memory responses. *Science immunology*, v. 6, n. 55, 8 jan. 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33419791>>. Acesso em: 2 maio 2021.

SONNENBERG, Gregory F; FOUSER, Lynette A; ARTIS, David. Functional biology of the IL-22-IL-22R pathway in regulating immunity and inflammation at barrier surfaces. *Advances in immunology*, v. 107, p. 1–29, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123813008000010>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

SOUZA, Patricia R *et al.* Enriched Marine Oil Supplements Increase Peripheral Blood Specialized Pro-Resolving Mediators Concentrations and Reprogram Host Immune Responses: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Circulation research*, v. 126, n. 1, p. 75–90, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31829100>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

SRIDHAR, Saranya *et al.* Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. *Nature medicine*, v. 19, n. 10, p. 1305–12, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24056771>>. Acesso em: 2 maio 2021.

STIER, Matthew T *et al.* STAT1 Represses Cytokine-Producing Group 2 and Group 3 Innate Lymphoid Cells during Viral Infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 199, n. 2, p. 510–519, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28576981>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

SUGIMOTO, Michelle A. *et al.* Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends in Immunology*, 13 fev. 2019a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30772190>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

SUGIMOTO, Michelle A. *et al.* Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends in Immunology*, v. 40, n. 3, p. 212–227, mar. 2019b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490619300079>>. Acesso em: 7 jun. 2021.

SUGIMOTO, Michelle A. *et al.* Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?

Frontiers in Immunology, v. 7, p. 160, 26 abr. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00160/abstract>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

SULLIVAN, Seth J *et al.* 2009 H1N1 influenza. *Mayo Clinic proceedings*, v. 85, n. 1, p. 64–76, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007905>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

TAN, Jean L *et al.* Amnion Epithelial Cells Promote Lung Repair via Lipoxin A4. *Stem cells translational medicine*, v. 6, n. 4, p. 1085–1095, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28371562>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

TATE, Michelle D *et al.* Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 183, n. 11, p. 7441–50, 1 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917678>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

TATE, Michelle D *et al.* Neutrophils sustain effective CD8(+) T-cell responses in the respiratory tract following influenza infection. *Immunology and cell biology*, v. 90, n. 2, p. 197–205, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21483446>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

TAVANO, Regina *et al.* Formyl-Peptide Receptor Agonists and Amorphous SiO₂-NPs Synergistically and Selectively Increase the Inflammatory Responses of Human Monocytes and PMNs. *Nanobiomedicine*, v. 3, p. 2, 1 jan. 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.5772/62251>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

TAVARES, Luciana P. *et al.* CXCR1/2 Antagonism Is Protective during Influenza and Post-Influenza Pneumococcal Infection. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1799, 13 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29326698>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

TAVARES, Luciana P *et al.* ACKR2 contributes to pulmonary dysfunction by shaping CCL5:CCR5-dependent recruitment of lymphocytes during influenza A infection in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, v. 318, n. 4, p. L655–L670, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31995405>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

TAVARES, Luciana P; TEIXEIRA, Mauro M; GARCIA, Cristiana C. The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, v. 66, n. 4, p. 283–302, abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744631>>. Acesso em: 22 mar.

2021.

TIMOTHY P. O'SULLIVAN, † *et al.* Aromatic Lipoxin A4 and Lipoxin B4 Analogues Display Potent Biological Activities. 2007. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jm060270d>>. Acesso em: 28 maio 2021.

TOTURA, Allison L *et al.* Toll-Like Receptor 3 Signaling via TRIF Contributes to a Protective Innate Immune Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *mBio*, v. 6, n. 3, p. e00638-15, 26 maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26015500>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

TRENTIN, P G *et al.* Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. *British journal of pharmacology*, v. 172, n. 12, p. 3058–71, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659822>>. Acesso em: 8 jun. 2021.

VAGO, Juliana P *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Journal of leukocyte biology*, v. 92, n. 2, p. 249–58, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493082>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

VAGO, Juliana P *et al.* Exploiting the pro-resolving actions of glucocorticoid-induced proteins Annexin A1 and GILZ in infectious diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 133, p. 111033, jan. 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33378946>>. Acesso em: 12 jul. 2021.

VAGO, Juliana P *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper modulates macrophage polarization and apoptotic cell clearance. *Pharmacological research*, v. 158, p. 104842, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32413484>>. Acesso em: 12 jul. 2021.

VAGO, Juliana P *et al.* Plasminogen and the Plasminogen Receptor, Plg-RKT, Regulate Macrophage Phenotypic, and Functional Changes. *Frontiers in immunology*, v. 10, p. 1458, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31316511>>. Acesso em: 22 abr. 2021.

VARSANO, Shabtai; SEGEV, David; SHITRIT, David. Severe and non-severe asthma in the community: A large electronic database analysis. *Respiratory Medicine*, v. 123, p. 131–139, fev. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611116303572>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

VASCONCELOS, Daniela P *et al.* Modulation of the inflammatory response to chitosan through M2 macrophage polarization using pro-resolution mediators. *Biomaterials*, v. 37, p. 116–23, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453942>>. Acesso

em: 20 jul. 2021.

VASHIST, Neha *et al.* Influenza-Activated ILC1s Contribute to Antiviral Immunity Partially Influenced by Differential GITR Expression. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 505, 2018.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29623077>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

WALKER, Jean *et al.* Lipoxin A4 Increases Survival by Decreasing Systemic Inflammation and Bacterial Load in Sepsis. *Shock*, v. 36, n. 4, p. 410–416, out. 2011. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00024382-201110000-00014>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

WANG, Ching-Shuen; BAKER, Olga J. The G-Protein-Coupled Receptor ALX/Fpr2 Regulates Adaptive Immune Responses in Mouse Submandibular Glands. *The American journal of pathology*, v. 188, n. 7, p. 1555–1562, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29684359>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

WANG, Hao *et al.* Aspirin-triggered resolvin D1 reduces pneumococcal lung infection and inflammation in a viral and bacterial coinfection pneumonia model. *Clinical science (London, England: 1979)*, v. 131, n. 18, p. 2347–2362, 15 set. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28779028>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

WANG, Qi *et al.* Lipoxin A4 Reduces Ventilator-Induced Lung Injury in Rats with Large-Volume Mechanical Ventilation. *Mediators of inflammation*, v. 2020, p. 6705985, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33299377>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

WANG, Qiong *et al.* MDA5 and TLR3 initiate pro-inflammatory signaling pathways leading to rhinovirus-induced airways inflammation and hyperresponsiveness. *PLoS pathogens*, v. 7, n. 5, p. e1002070, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637773>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

WANG, Zhongfang *et al.* Recovery from severe H7N9 disease is associated with diverse response mechanisms dominated by CD8⁺ T cells. *Nature communications*, v. 6, p. 6833, 13 maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25967273>>. Acesso em: 2 maio 2021.

WEI, Jessica *et al.* A novel role for lipoxin A4 in driving a lymph node-eye axis that controls autoimmunity to the neuroretina. *eLife*, v. 9, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32118582>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

WEINBERGER, Barry *et al.* Mechanisms mediating reduced responsiveness of neonatal neutrophils to lipoxin A4. *Pediatric research*, v. 64, n. 4, p. 393–8, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535486>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

WHITE, D A; STOVER, D E. Severe bleomycin-induced pneumonitis. Clinical features and

response to corticosteroids. *Chest*, v. 86, n. 5, p. 723–8, nov. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207992>>. Acesso em: 31 jan. 2017.

WHITE, Mitchell R *et al.* Impact of neutrophils on antiviral activity of human bronchoalveolar lavage fluid. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, v. 293, n. 5, p. L1293-9, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17720872>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

WILEY, Christopher D *et al.* Secretion of leukotrienes by senescent lung fibroblasts promotes pulmonary fibrosis. *JCI insight*, v. 4, n. 24, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31687975>>. Acesso em: 3 maio 2021.

WILKINSON, Tom M *et al.* Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nature medicine*, v. 18, n. 2, p. 274–80, 29 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286307>>. Acesso em: 2 maio 2021.

WU, Jun *et al.* Regulation of aquaporin 4 expression by lipoxin A4 in astrocytes stimulated by lipopolysaccharide. *Cellular immunology*, v. 344, p. 103959, out. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31383359>>. Acesso em: 16 jul. 2021.

WYNN, Thomas A.; CHAWLA, Ajay; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 24 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature12034>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

YANG, Yiyi *et al.* Resolvin D1 attenuates mechanical stretch-induced pulmonary fibrosis via epithelial-mesenchymal transition. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, v. 316, n. 6, p. L1013–L1024, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30724098>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

YARA, S *et al.* FTS reduces bleomycin-induced cytokine and chemokine production and inhibits pulmonary fibrosis in mice. *Clinical and experimental immunology*, v. 124, n. 1, p. 77–85, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359445>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

YOON, Young-So *et al.* Coordinated induction of cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 and hepatocyte growth factor by apoptotic cells prevents lung fibrosis. *Journal of leukocyte biology*, v. 94, n. 5, p. 1037–49, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922381>>.

ZHANG, Ting *et al.* Influenza Virus Z-RNAs Induce ZBP1-Mediated Necroptosis. *Cell*, v. 180, n. 6, p. 1115–1129.e13, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32200799>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

ZHANG, X *et al.* Magnolol reduces bleomycin-induced rodent lung fibrosis. *Int J Clin Exp Med*, v. 8, n. 9, p. 15450–15457, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629034>>.

ZHAO, Yingying *et al.* Neutrophils may be a vehicle for viral replication and dissemination in human H5N1 avian influenza. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 47, n. 12, p. 1575–8, 15 dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990065>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

ZHENG, Shengxing *et al.* Lipoxin A₄ promotes lung epithelial repair whilst inhibiting fibroblast proliferation. *ERJ Open Research*, v. 2, n. 3, p. 00079–02015, 4 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27957484>>. Acesso em: 13 dez. 2018.

ZHU, Xiaojia *et al.* Lipoxin A₄ activates ALX/FPR2 to attenuate inflammation in *Aspergillus fumigatus* keratitis. *International Immunopharmacology*, v. 96, p. 107785, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576921004215?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 jul. 2021.