

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISABELLA ZAIDAN MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ANGIOTENSINA-(1-7) E DO SEU RECEPTOR
MAS EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

Belo Horizonte

2022

ISABELLA Z Aidan Moreira

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ANGIOTENSINA-(1-7) E DO SEU RECEPTOR
MAS EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa.

Coorientadora: Dra. Luciana Pádua Tavares.

Belo Horizonte

2022

M838a Moreira, Isabella Zaidan.
Avaliação do papel da angiotensina-(1-7) e do seu receptor Mas em modelos pré-clínicos de doenças infecciosas [recurso eletrônico] / Isabella Zaidan Moreira. – 2022.
1 recurso eletrônico (96 f. : il.) : pdf

Orientadora: Lirlândia Pires de Sousa.
Coorientadora: Luciana Pádua Tavares.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Infecção – Teses. 2. Angiotensina – Receptores – Teses. 3. Peritonite – Teses. 4. Pneumonia – Teses. I. Sousa, Lirlândia Pires de. II. Tavares, Luciana Pádua. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

“AVALIAÇÃO DO PAPEL DA ANGIOTENSINA-(1-7) E DO SEU RECEPTOR MAS EM MODELOS PRÉ-CLÍNICOS DE DOENÇAS INFECCIOSAS”

ISABELLA ZAIDAN MOREIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Comissão

Dra. Michelle Adriane Amantea Sugimoto
William Harvey Research Institute-London-UK

Dra. Cristiana Couto Garcia
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Renes de Resende Machado
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dra. Luciana Pádua Tavares - Coorientadora
Brigham and Womens Hospital-Harvard Med School-EUA

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Adriane Amantea Sugimoto**, **Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renes de Resende Machado, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Padua Tavares, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lirlandia Pires de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiana Couto Garcia, Usuária Externa**, em 20/12/2022, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1972288** e o código CRC **A1E57C2B**.

AGRADECIMENTOS

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

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

À minha co-orientadora, Dr^a. Luciana Pádua Tavares, pela paciência e pela disponibilidade em ajudar na construção deste trabalho.

Agradeço também à toda equipe do laboratório de Sinalização da Inflamação e Neoplasias, em especial à Laís, que foi meu braço direito em muitos dos experimentos realizados! A forma como trabalhamos em equipe tornou o processo bem mais prazeroso.

Aos professores do Laboratório de Imunofarmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, que sempre estavam dispostos a colaborar.

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

RESUMO

As doenças infecciosas representam uma das principais causas de morte em todo o mundo. A disponibilidade limitada de terapias antimicrobianas e o aumento da resistência às drogas existentes tornam o manejo terapêutico de doenças infecciosas um grande desafio. A inflamação é uma resposta fisiológica primordial para proteger o hospedeiro contra microrganismos invasores e deve ser balanceada e autolimitada para que haja *clearance* do patógeno e restauração da homeostase tecidual. No entanto, a exacerbação das respostas inflamatórias é um dos fatores determinantes para a gravidade e mortalidade durante infecções. Estudos recentes evidenciam o papel da resolução da inflamação na modulação das respostas do hospedeiro a fim de garantir controle do patógeno e da intensidade da resposta inflamatória durante infecções. A resolução da inflamação é um processo ativo e integrado que é coordenado por diferentes mediadores pró-resolutivos, incluindo a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] - um peptídeo bioativo endógeno que faz parte do eixo contra regulatório do sistema renina angiotensina (SRA). As ações da Ang-(1-7) ocorrem principalmente através de sua ligação ao receptor Mas (MasR), um receptor acoplado à proteína G. Dentre suas ações anti-inflamatórias, a Ang-(1-7), agindo via MasR, reduz o recrutamento de leucócitos, especialmente granulócitos, e previne a lesão tecidual relacionada à hiperativação da inflamação, como a fibrose. O presente trabalho demonstra a importância do eixo Ang-(1-7)/Mas em dois modelos infecciosos: peritonite induzida por *Escherichia coli* e pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa*. No modelo de peritonite, a ausência do receptor Mas resultou em um atraso na resolução da inflamação, por comprometer o recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal, reduzindo a eferocitose de neutrófilos apoptóticos e o *clearance* bacteriano. De modo semelhante, durante a pneumonia induzida por *P. aeruginosa*, animais deficientes para o receptor Mas (MasR^{-/-}) também desenvolveram uma forma mais grave de pneumonia, apresentando maior número de neutrófilos no BAL, maior carga bacteriana, além de níveis aumentados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias quando comparado aos animais WT. Análises histopatológicas dos pulmões mostram um grande comprometimento pulmonar após infecção com *P. aeruginosa*, que foram semelhantes nos dois genótipos. De forma interessante, o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de diminuir o infiltrado neutrofílico associado com diminuição dos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no BAL, pulmão e plasma dos animais infectados. Além disso, o peptídeo foi capaz de diminuir a carga bacteriana e reduzir o dano pulmonar decorrente da inflamação causada por *P. aeruginosa*. A identificação dos mecanismos pró-resolutivos e anti-inflamatórios da Ang-(1-7) abrirá caminho para o desenvolvimento de terapias direcionadas ao hospedeiro que promovam mecanismos de resistência e resiliência às infecções.

Palavras-chave: infecção; resolução farmacológica; Angiotensina-(1-7); receptor Mas.

ABSTRACT

Infectious diseases represent one of the leading causes of death worldwide. The limited availability of antimicrobial therapies and increased resistance to existing drugs make the therapeutic management of infectious diseases a challenge. Inflammation is a primordial physiological response aimed to protect the host against invading microorganisms and must be balanced and self-limited to ensure pathogen clearance and tissue homeostasis. However, overwhelming, or dysfunctional inflammation is a determinant factor for severity and mortality during infections. In recent years, emerging studies have highlighted the role of inflammation resolution on modulating host responses to ensure pathogen control and inflammatory responses during infections. Inflammation resolution is an active and integrated process that is coordinated by different pro-resolving mediators, including Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] - an endogenous bioactive peptide that takes part of the counter-regulatory axis of the renin-angiotensin system (RAS). The actions of Ang-(1-7) occur mainly through its binding to the Mas receptor (MasR), a G protein-coupled receptor. Among its anti-inflammatory actions, Ang-(1-7) acting via MasR, reduces the recruitment of leukocytes, especially granulocytes, and prevents tissue damage related to the overactivation of inflammation, such as fibrosis. The present work highlights the importance of the Ang-(1-7)/Mas axis in two different infectious models: peritonitis induced by *Escherichia coli* and pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. In the peritonitis model, the absence of the Mas receptor resulted in a delay on resolution of inflammation, by compromising the recruitment of macrophages to the peritoneal cavity, reducing the efferocytosis of apoptotic neutrophils and bacterial clearance. Similarly, during *P. aeruginosa*-induced pneumonia, Mas receptor-deficient mice also developed a more severe form of pneumonia, with higher numbers of neutrophils in the BAL, increased bacterial load, and higher levels of cytokines and chemokines as compared to WT mice. Histopathological analyzes of the lungs show severe pulmonary damage after *P. aeruginosa* infection, which were similar in both genotypes. Interestingly, treatment with Ang-(1-7) during *P. aeruginosa* infection was able to decrease neutrophilic infiltration alongside decreased levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines in BAL, lung and plasma of infected animals. Moreover, the peptide was able to decrease the bacterial load and reduces the *P. aeruginosa*-elicited lung damage. The identification of pro-resolving and anti-inflammatory mechanisms of Ang-(1-7) will pave the way for the development of host-directed therapies in order to promote mechanisms of resistance and resilience to infections.

Keywords: infection; resolution pharmacology; Angiotensin-(1-7); Mas receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resumo das interações que ocorrem entre leucócitos e células endoteliais durante a inflamação.

Figura 2: Série orquestrada de eventos que levam a resolução do processo inflamatório agudo.

Figura 3: Esquema simplificado do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRA).

Figura 4: A inibição de MasR impede a resolução da peritonite induzida por *E. coli*.

Figura 5: Animais MasR^{-/-} apresentam menor recrutamento de monócitos e *clearance* bacteriano.

Figura 6: O tratamento com Ang-(1-7) promove a fagocitose de *E. coli in vitro*.

Figura 7: O receptor MasR é importante para a eferocitose de neutrófilos apoptóticos.

Figura 8: Cinética da resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *P. aeruginosa*.

Figura 9: Os animais MasR^{-/-} apresentam exacerbação da inflamação pulmonar desencadeada pela infecção por *P. aeruginosa*.

Figura 10: Os animais MasR^{-/-} apresentam dano pulmonar semelhante aos animais WT.

Figura 11: Efeito do tratamento com o peptídeo Ang-(1-7) sobre a inflamação pulmonar desencadeada pela infecção por *P. aeruginosa*.

Figura 12: Efeito do tratamento com Ang-(1-7) sobre o dano pulmonar causado pela infecção por *P. aeruginosa*.

Figura 13: O eixo Ang-(1-7)/MasR está envolvido com a fagocitose de *P. aeruginosa in vitro*.

Figura 14: O tratamento com Ang-(1-7) protege parte dos camundongos da letalidade causada por *P. aeruginosa*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos anti-inflamatórios do eixo ECA2/Ang-(1-7)/MasR em modelos pré clínicos de doenças.

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp: aminopeptidase

AMPC: adenosina 3,5-monofosfato cíclico

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7)

Ang-(1-9): Angiotensina-(1-9)

ANOVA: análise de variância

AT1R: Receptor de Angiotensina do tipo I

AT2R: Receptor de Angiotensina do tipo II

BAL: *bronchoalveolar lavage* - lavado bronco-alveolar

BMDM: *Bone Marrow-Derived Macrophages* - Macrófagos Derivados da Medula Óssea

BNE: Banda Não Específica

BSA: Albumina Sérica Bovina

CCL2: *Chemokine (C-C motif) ligand 2* – Quimiocina ligante tipo 2

CCR2: *Chemokine (C-C motif) receptor type 2* – Receptor de quimiocinas tipo 2

CFSE: *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* - éster succinimidílico da carboxifluoresceína

CLP: *cecal ligation puncture* - ligadura e punção cecal

CXCL1: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1* – Quimiocina ligante tipo 1

DAMPs: *Damage Associated-Molecular Patterns* – Padrões Moleculares associados a Danos

DSS: *Dextran Sulfate Sodium*

ECA 2: Enzima Conversora de Angiotensina II

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* - ácido etilenodiamino tetra-acético

H₂SO₄: ácido sulfúrico

i.p.: intraperitonal

IAV: Influenza A Vírus

IL-(): interleucina-()

kDa: quilodalton

LB: Luria-Bertani

LPS: Lipopolissacarídeo

M1: macrófagos do tipo 1

M2: macrófagos do tipo 2

MAMPs: *Microbe Associated-Molecular Patterns* – Padrões Moleculares associados a Microorganismos

MasR^{-/-}: *Mas receptor knockout* – animal deficiente para o receptor Mas

MasR: Receptor Mas

MMP-(): *Matrix Metalloproteinase*

MOI: *multiplicity of infection* – multiplicidade de infecção

Mres: macrófagos resolutivos

NaCl: cloreto de sódio

NEP: endopeptidase neutra

NET: *Neutrophil Extracellular Traps* - armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF-κB: *nuclear factor kappa B* - fator nuclear kappa B

NO: Óxido Nítrico

OPD: *o-phenylenediamine dihydrochloride* – dicloridrato de o-fenilenodiamina

PBS: *phosphate-Buffered Saline* – Tampão fosfato salina

PEP: prolil endopeptidase

PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride* - fluoreto de fenilmetilsulfonil

SRA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

TLR: *Toll like Receptor* - Receptor do tipo Toll

TNF-α: *necrosis Factor alpha* – fator de necrose tumoral alfa

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

WT: *wild-type* –camundongos selvagem/não transgênico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Inflamação	13
1.2 Resolução da Resposta Inflamatória	18
1.3 O Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRA) e a produção de Angiotensina-(1-7)	20
1.4 Estudos de Ang-(1-7) em modelos infecciosos	24
1.5 Pneumonia causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.6 Peritonite causada por <i>Escherichia coli</i>	29
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 Animais	34
4.2 Drogas e reagentes	34
4.3 Peritonite induzida por <i>E. coli</i>	34
4.4 Cálculo do intervalo de resolução da peritonite induzida por <i>E. coli</i>	35
4.6 Ensaio de fagocitose e <i>killing</i>	36
4.7 Ensaio de eferocitose <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	36
4.8 Pneumonia induzida por <i>P. aeruginosa</i>	37
4.9 Lavado broncoalveolar (BAL).....	37
4.10 Determinação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>P. aeruginosa</i> no BAL e no pulmão de animais infectados.....	38
4.11 Avaliação da expressão do receptor Mas e da proteína Anexina A1 por <i>Western Blot</i>	38
4.11.1 Obtenção dos extratos protéicos.....	38
4.11.2 Quantificação de proteínas totais nas amostras obtidas	38
4.11.3 Fracionamento eletroforético e transferência.....	39
4.11.4 Immunoblot e revelação.....	39
4.12 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA	40
4.13 Análise histológica	41
4.14 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS ALCANÇADOS	42
5.1 Resultados pertinentes ao modelo de infecção por <i>E. coli</i>	42

5.1.1 O antagonismo do receptor Mas (MasR) com A779 impede a resolução da inflamação em um modelo de peritonite induzido por <i>E. coli</i>	42
5.1.2 A deficiência genética do receptor Mas compromete o recrutamento de células mononucleares para a cavidade peritoneal durante a fase resolutiva da peritonite induzida por <i>E. coli</i> e o clearance bacteriano.....	43
5.1.3 O peptídeo angiotensina (1-7) induz a fagocitose de <i>E. coli</i> por macrófagos	44
5.1.4 O eixo Ang-(1-7)/MasR está envolvido na eferocitose de neutrófilos apoptóticos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	45
5.2 Resultados pertinentes ao modelo de infecção por <i>P. aeruginosa</i>	47
5.2.1 A infecção por <i>P. aeruginosa</i> induz uma resposta inflamatória exacerbada nos pulmões marcada por intenso infiltrado neutrofílico	47
5.2.2 Animais deficientes para o receptor Mas (MasR ^{-/-}) apresentam exacerbação da inflamação em um modelo de pneumonia induzida por <i>P. aeruginosa</i>	49
5.2.3 Animais WT e MasR ^{-/-} apresentam dano pulmonar semelhante após a infecção por <i>P. aeruginosa</i>	51
5.2.4 O tratamento com Ang-(1-7) atenua a resposta inflamatória durante a pneumonia induzida por <i>P. aeruginosa</i>	53
5.2.5 O tratamento com Ang-(1-7) é capaz de atenuar o dano pulmonar causado pela infecção por <i>P. aeruginosa</i>	55
5.2.6 O eixo Ang-(1-7)/MasR está envolvido com a fagocitose de <i>P. aeruginosa</i> por macrófagos.....	57
5.2.7 O tratamento com Ang-(1-7) protege parte dos camundongos da letalidade causada por <i>P. aeruginosa</i>	58
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÃO.....	69
8. RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E DE OUTRAS ATIVIDADES NO PERÍODO	70
8.1 Artigos completos publicados em periódicos.....	70
8.2 Capítulo de livro	71
8.3 Participação em eventos	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXO A – Artigo como primeira autora gerado durante o Doutorado	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

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

A resposta inflamatória bem sucedida resulta na eliminação do agente indutor da inflamação, no reparo tecidual, e no estabelecimento de uma memória imunológica que garanta uma resposta mais rápida e específica em uma futura infecção pelo mesmo agente (Medzhitov, 2010; Fullerton & Gilroy, 2016). A inflamação já é reconhecida pela humanidade há milhares de anos especialmente por possuir sinais e sintomas bastante notáveis e por ser um processo fisiológico que acompanha as infecções. Com base na descrição feita pelo médico romano Cornelius Celsus, no primeiro século a.C., são reconhecidos como sinais cardinais e sintomas da inflamação: o rubor (vermelhidão devido à hiperemia), o tumor (inchaço causado por aumento da permeabilidade microvascular e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), o calor (associado com o aumento do fluxo sanguíneo e febre), e a dor (devido a estimulação das terminações nervosas). Um quinto sinal foi adicionado posteriormente por Rudolf Virchow em 1858, a perda da função, associada à disfunção dos tecidos-alvo do processo inflamatório (Medzhitov, 2010).

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

Atualmente se reconhece que a inflamação é um processo complexo e altamente coordenado, constituído por múltiplos componentes, e que pode ser controlado nas suas diferentes fases. Resumidamente, a resposta inflamatória é iniciada pelo reconhecimento do agente indutor por meio de sensores presentes em células residentes do tecido, como os macrófagos, linfócitos, mastócitos, células dendríticas e células epiteliais. Em seguida ocorre a produção de mediadores inflamatórios solúveis, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, radicais livres, mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (eicosanóides) e componentes do sistema do complemento. Como resultado, ocorrem a quimiotaxia dos leucócitos para o sítio inflamatório, favorecidos pela regulação positiva de moléculas de adesão em ambos, leucócitos circulantes e células endoteliais (Galvão et al. 2018; Medzhitov 2010).

Considerando o contexto infeccioso aqui estudado, os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio inflamatório são os neutrófilos. Essas células desempenham um papel inicial crítico no controle de infecções, primeiro fagocitando os microorganismos e depois liberando mediadores que atraem outros leucócitos para o tecido lesionado (De Filippo et al. 2013). Portanto, é importante entender como essas células são recrutadas. As quimiocinas CXCL1, CXCL2 e, em alguns cenários, CXCL5, CXCL7 e CXCL8, são quimioatraentes potentes para qual os neutrófilos respondem (De Filippo et al. 2013). Mastócitos e macrófagos produzem uma ampla gama de mediadores capazes de modificar as respostas imunes. Ambas as células contribuem para os estágios iniciais de recrutamento de neutrófilos para os tecidos, através da liberação dos quimioatraentes de neutrófilos, CXCL1 e CXCL2, após a estimulação com LPS. Essa liberação de mediadores que atuam no recrutamento de mais neutrófilos para o tecido, depende do *milieu* inflamatório (De Filippo et al. 2013). Como para os neutrófilos, os monócitos expressam uma variedade de receptores de quimiocinas. Um exemplo clássico de receptor associado ao recrutamento de monócitos é o receptor CCR2, que está relacionado à resposta imune contra infecções e também a patogênese de desordens inflamatórias. A quimiocina CCL2 é o principal ligante de CCR2, classicamente associada ao recrutamento dessas células para o tecido. Camundongos com deficiência desse receptor

mostram susceptibilidade aumentada a infecções por alguns patógenos, incluindo a bactéria intracelular *Listeria monocytogenes* (Serbina and Pamer 2006). Mas, de forma contrária, são protegidos do desenvolvimento de aterosclerose e encefalite autoimune, duas doenças inflamatórias macrófago-mediadas (Serbina and Pamer 2006). CCL2 estimula a quimiotaxia de monócitos e vários eventos celulares associados à quimiotaxia, incluindo fluxo de Ca^{2+} e expressão de integrinas. É também um indutor da produção de citocinas por monócitos e, em altas concentrações, desencadeia um *burst* oxidativo levando à geração de espécies reativas de oxigênio (Palomino and Marti 2015).

O processo de recrutamento de leucócitos para o tecido é complexo, mas pode ser didaticamente dividido em etapas. De maneira resumida, os leucócitos são atraídos do lúmen para a parede do vaso sanguíneo, são capturados, rolam pelo endotélio por meio de interações fracas mediadas por selectinas e sofrem ativação celular. Posteriormente ocorre uma adesão mais firme ao endotélio, devido ao aumento da expressão de integrinas, permitindo a transmigração e a migração dos leucócitos para o tecido a favor de um gradiente quimiotático (Simon & Green, 2005; Petri et al., 2008; Yuan et al., 2012; Kratofil et al. 2017) representado na **Figura 1**. Ao atingir o sítio inflamatório, esses leucócitos funcionam primariamente como fagócitos para a eliminação de microrganismos e restos celulares por diferentes mecanismos. Dentre outros mecanismos efetores, pode-se citar a fagocitose, a netose, ou lançamento de armadilhas neutrofílicas (NETs) compostas majoritariamente por material genético e proteases, a liberação de proteases e a geração de espécies reativas de oxigênio (Hickey and Kubes 2009).

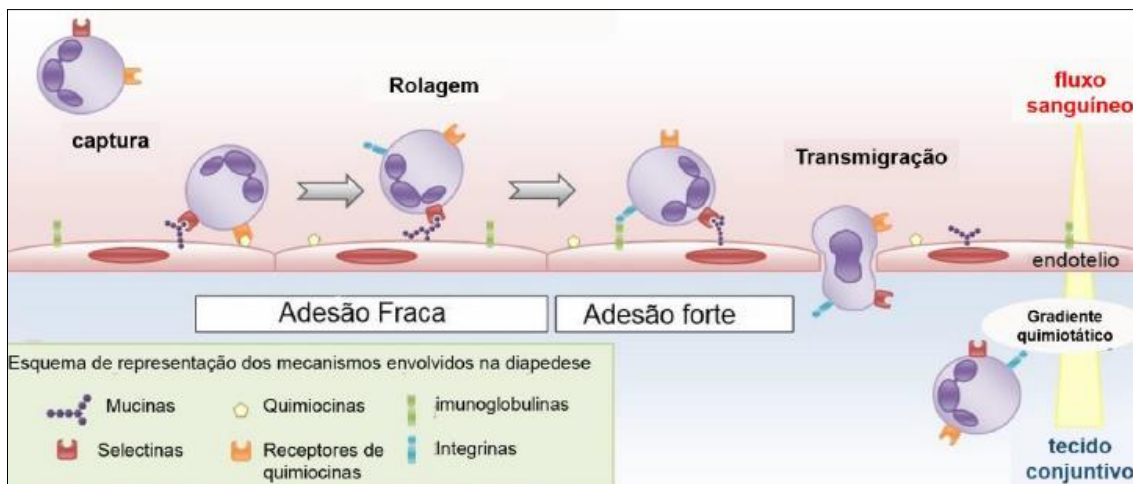


Figura 1: Resumo das interações que ocorrem entre leucócitos e células endoteliais durante a inflamação. Diante de estímulos inflamatórios, moléculas de adesão são mais expressas em neutrófilos e células endoteliais. Os neutrófilos rolam ao longo da parede endotelial vascular realizando interações fracas mediadas pelas selectinas. A partir daí, ocorre uma adesão firme dos neutrófilos com o endotélio, por meio de moléculas de adesão (ICAM-1 e VLA) na superfície da célula endotelial e integrinas (Mac-1 e VLA) na superfície do neutrófilo. Por fim, os neutrófilos transmigram através do endotélio por meio de um processo que envolve interações complexas com moléculas juncionais do endotélio, VE- caderina, JAMs e PECAM-1. Adaptado de Yuan et al., 2012.

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

Em adição à primeira onda de migração de neutrófilos, ocorre migração de monócitos os quais se diferenciam em macrófagos ao atingirem o tecido. Os macrófagos são considerados fagócitos profissionais, ou seja, células cuja função primária é a de fagocitar partículas inertes ou microrganismos. Os macrófagos também estão envolvidos na remoção de células apoptóticas que são geradas durante a remodelação tecidual e resolução dos processos inflamatórios (Watanabe et al. 2019). Além de amplificarem a resposta efetora dos neutrófilos, por meio da produção de mediadores inflamatórios

como citocinas e quimiocinas e também dos processos de *clearance*, os macrófagos desempenham um papel importante na resposta imune adaptativa, como apresentadores de antígenos aos linfócitos (Nathan, 2008; Poon *et al.*, 2014). É importante ressaltar que os macrófagos são células altamente plásticas que adotam fenótipos distintos dependendo do estímulo a que estejam submetidos (Mosser and Edwards 2008).

Tanto os neutrófilos quanto os macrófagos agem no reconhecimento de MAMPs (padrões moleculares associados a microrganismos, do inglês: *microbe associated molecular patterns*) e DAMPs (padrões moleculares associados ao dano celular, do inglês: *damage associated molecular patterns*), por meio de receptores de reconhecimento de padrão, do inglês PRRs, que incluem os receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês: *toll-like receptors*), ou outros da resposta imune inata. Um dos receptores mais estudados é o TLR4, que medeia respostas às bactérias Gram negativas por meio do reconhecimento do lipopolissacarídeo de membrana, o LPS. Este reconhecimento desencadeia a ativação de cascatas de sinalização intracelulares e de genes pró-inflamatórios, a produção de mediadores, recrutamento leucocitário e estabelecimento do processo inflamatório (Prince *et al.*, 2011).

Apesar de ser reconhecida durante muitos anos como uma resposta patológica associada a infecções, a inflamação deve ser entendida como um processo fisiológico, que quando autolimitada é uma resposta essencial para o hospedeiro, garantindo a contenção do patógeno invasor enquanto desencadeia o reparo do tecido danificado (Neth *et al.* 2005). De fato, deficiências nas vias inflamatórias podem ser traduzidas clinicamente numa maior suscetibilidade a infecções graves, especialmente no contexto de infecções bacterianas (Neth *et al.* 2005). Por outro lado, a inflamação persistente ou não resolvida pode cronificar ou piorar a doença, levando à disfunção de barreira epitelial, falência de órgãos e, finalmente, morte do hospedeiro (Costa *et al.* 2013; Fagundes *et al.* 2012; Sugimoto *et al.* 2019, Tavares *et al.* 2022). Nesse sentido, uma vez que o indutor inflamatório seja neutralizado, a resposta deve se direcionar para o processo de resolução da inflamação com o objetivo de retorno a homeostase tecidual. A resposta inflamatória disfuncional com relação a intensidade, temporalidade e espaço está muitas vezes relacionada ao desenvolvimento de

doenças. Dessa forma, identificar e distinguir vias inflamatórias protetoras daquelas prejudiciais pode favorecer o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas focadas em medicamentos anti-inflamatórios para minimizar os sintomas e diminuir a mortalidade por doenças infecciosas (Garcia et al. 2010).

1.2 Resolução da Resposta Inflamatória

A resolução da inflamação é um processo ativo que envolve a produção e ativação de diferentes mediadores bioquímicos e vias de sinalização para assegurar uma restauração rápida e bem-sucedida da homeostase dos tecidos após inflamação. Vários são os passos que conduzem a resolução eficiente do processo inflamatório, como: cessamento do recrutamento de neutrófilos, tamponação/inativação dos mediadores pró-inflamatórios, indução da apoptose de neutrófilos seguido de *clearance* dos corpos apoptóticos pelos macrófagos, recrutamento não flogístico de monócitos que se diferenciam localmente em macrófagos, mudanças do fenótipo dos macrófagos para perfis resolutivos com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos (Alessandri et al. 2013; Sugimoto et al. 2016). Esses eventos estão representados na **Figura 2**.

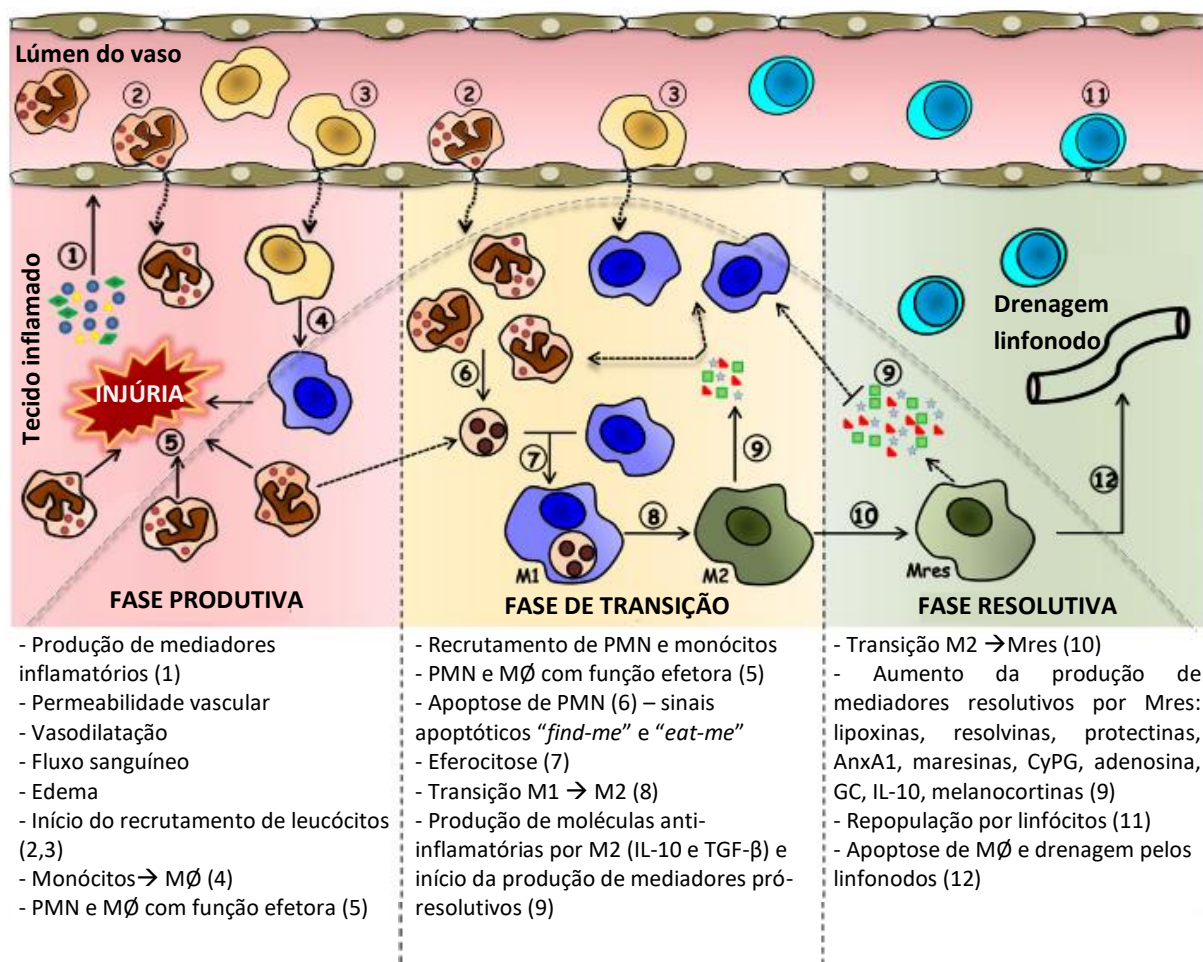


Figura 2: Série orquestrada de eventos que levam a resolução do processo inflamatório agudo. A lesão tecidual estéril ou infecciosa leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou MAMPs) pelas células residentes, as quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios. Na fase produtiva da inflamação, esses mediadores levam à ativação endotelial e recrutamento de leucócitos para o local inflamado. Leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são geralmente as primeiras células a serem recrutadas, seguidas de monócitos. Essas células exercem, portanto, suas funções efetoras contra o agente responsável pela lesão. Em uma fase de transição, ocorre intensa apoptose de PMNs, seguida por eferocitose por macrófagos, que alteram, conseqüentemente, seu perfil inflamatório (M1) para anti-inflamatório (M2). Esses macrófagos liberam mediadores anti-inflamatórios e resolutivos, essenciais para o início do processo de resolução. Nesse processo, macrófagos do tipo M2 têm seu perfil alterado para macrófagos do tipo resolutivo (Mres), que produzem moléculas antioxidantes e antifibróticas, conduzindo finalmente ao retorno da homeostase tecidual com o mínimo de lesão. Adaptado de Alessandri *et al.*, 2013.

Como mencionado, essas etapas não ocorrem passivamente, mas são ativamente induzidas e controladas pelos mediadores pró-resolutivos. Tais mediadores são de natureza bioquímica diversa e incluem lipídeos (mediadores pro-resolutivos especializados – SPMs, do inglês *specialized proresolving mediators*), proteínas (Anexina A1, galectinas), gases (H₂S e CO), purinas (adenosina), bem como neuromoduladores liberados sob o controle do nervo

vago (acetilcolina e outros neuropeptídeos) (Sugimoto et al. 2016). Mais recentemente, estudos demonstraram que o peptídeo Angiotensina-(1-7) atua em diferentes eventos chave da resolução da inflamação, incluindo a indução da apoptose de polimorfonucleares e do processo de eferocitose (Barroso et al., 2017; Magalhaes et al., 2018) e a reprogramação de macrófagos *in vitro* e *in vivo* (Santuchi et al. 2019; Hammer et al. 2016; Zaidan et al. 2022) e aumentando o *clearance* bacteriano (Melo et al. 2021; Zaidan et al. 2022)

Apesar da crescente identificação e descrição dos mediadores resolutivos pela literatura, novas moléculas endógenas promotoras da resolução tendem a ser descobertas à medida que se amplia o entendimento sobre a resolução da inflamação, seus mecanismos e os diferentes sistemas biológicos com os quais interagem a fim de contribuírem para homeostase (Tavares et al. 2022).

1.3 O Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRA) e a produção de Angiotensina-(1-7)

O sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA) é classicamente conceituado como um sistema humoral que controla diversas funções cardiovasculares, renais e adrenais; além do equilíbrio de líquidos e eletrólitos. A cascata do chamado SRA clássico inicia-se com a biossíntese da enzima renina pelas células justaglomerulares renais a partir da pró-renina (Griendling *et al.*, 1993). Após clivagens sequenciais, a renina ativa é secretada na circulação sanguínea (Naruse *et al.*, 1982), clivando o angiotensinogênio proveniente do fígado e formando o decapeptídeo inativo Angiotensina I (Ang I). Este é hidrolisado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), culminando na formação de Angiotensina II (Ang II) (Carey & Siragy, 2003; Lovren *et al.*, 2008), cujos efeitos vasculares, cardíacos, renais e adrenais são mediados por dois receptores acoplados à proteína G, a saber, AT1 e AT2 (Nguyen Dinh Cat and Touyz 2011) **Figura 3.**

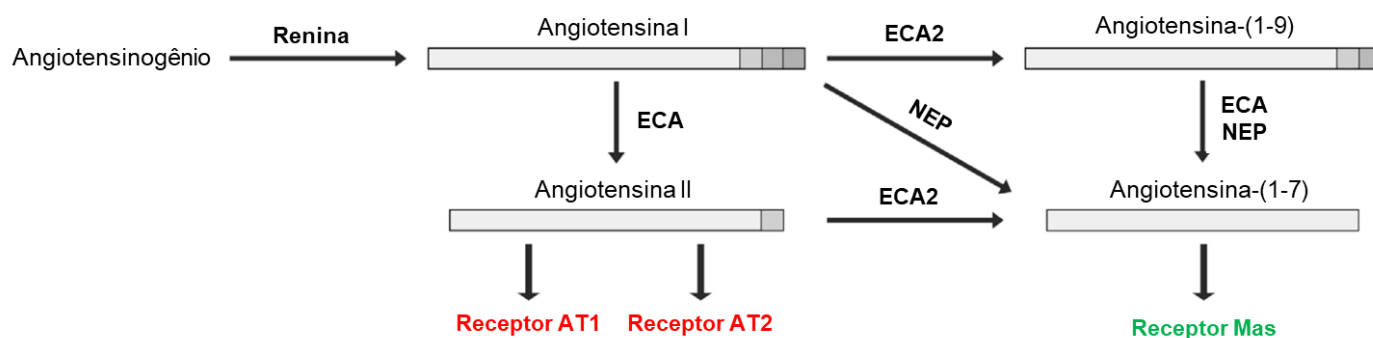


Figura 3: Esquema simplificado do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRA). ECA, Enzima Conversora de Angiotensina; ECA2, Enzima Conversora de Angiotensina 2; Ang 1-7, Angiotensina-(1-7); Ang 1-9, Angiotensina-(1-9), Ang I, Angiotensina I; Ang II, Angiotensina II, AT1, receptor de Angiotensina do tipo um, AT2, Receptor de Angiotensina do tipo dois, MasR, Receptor de Angiotensina (1-7) Adaptado de Prestes *et. al.*, 2016.

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

A identificação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que antagoniza algumas das ações do eixo Ang II/ECA/AT1 ao promover a degradação de Ang II para o nonapeptídeo angiotensina-(1-9) e o heptapeptídeo angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (Lovren *et al.* 2008; Nguyen Dinh Cat and Touyz 2011), permitiu a descrição de um eixo alternativo no SRA (Lautner *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2007). A Ang-(1-7) também pode ser sintetizada por outras vias a partir de Ang I ou da própria angiotensina-(1-9) pela ação de endopeptidases e, uma vez formada, pode ser degradada pela ECA e por aminopeptidases em fragmentos inativos (Yamamoto *et al.* 1992). A Ang-(1-7) está presente tanto na circulação como nos tecidos, incluindo o cérebro, coração, vasos sanguíneos, entre outros (Sampaio *et al.* 2007). De forma contrária à Ang II, a Ang-(1-7) é um potente vasodilatador (Ferrario *et al.* 1997), possuindo também efeitos

antiproliferativos e anti-inflamatórios (Souza and Costa-Neto 2012). Esses efeitos são mediados pelo receptor Mas acoplado à proteína G, do qual esse heptapeptídeo é um agonista endógeno (Santos et al. 2003). Em camundongos, esse receptor está expresso em vários tecidos como o cérebro, testículo, coração e pulmão (Bader et al. 2014). Em humanos, o receptor Mas é expresso nos rins, cérebro, coração, olhos, adrenais e células do sistema vascular (Santos et al. 2003). A utilização de bloqueadores farmacológicos, como o (D-Ala7)-Angiotensina I/II (1-7) (A779) em estudos do papel do receptor Mas *in vivo* e *in vitro*, têm sido de grande valia para a compreensão das vias intracelulares ativadas pela interação Ang-(1-7)-receptor Mas, que levam aos efeitos anteriormente citados em diversos modelos experimentais (Chen et al. 2017; da Silveira et al. 2010; Souza and Costa-Neto 2012; Villalobos et al. 2016).

A Ang-(1-7) atua como um peptídeo contrarregulador da Ang II por meio da oposição aos seus efeitos, especialmente, vasoconstrição e proliferação celular. Ang-(1-7) possui atividade biológica em vários órgãos. No coração, a Ang-(1-7) exerce um papel cardioprotetor, podendo prevenir o remodelamento cardíaco, via redução da hipertrofia e fibrose. Esse peptídeo tem atividade vasodilatadora dependente do endotélio. De fato, Ang-(1-7) pode estimular a produção de óxido nítrico (NO) (Ferrario et al. 1997; Sampaio et al. 2007) por meio de uma via dependente de AKT, prostaglandinas ou fator relaxante derivado do endotélio, além de potencializar a ação da bradicinina. Possui, também, efeito antiproliferativo em células de músculo liso vascular e tecido fibrovascular, é antitrombótico e antiarrítmico e inibe a expressão da ECA (Ferrario et al. 1997; Sampaio et al. 2007). Além disso, Ang-(1-7) pode atuar como um importante neuromodulador, especialmente em áreas relacionadas com o controle tônico e reflexo da pressão arterial (Santos et al. 2000).

Mais recentemente, estudos demonstraram que a Ang-(1-7) modula a migração de leucócitos, a expressão e liberação de citocinas e ativação de vias inflamatórias. Foi demonstrado que o tratamento com Ang-(1-7) é capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos e diminuir o dano tecidual em um modelo de artrite induzida por antígeno (Da Silveira et al. 2010). Em outro modelo de insuficiência renal aguda, induzida por isquemia e reperfusão, o tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE 0991, foi capaz de diminuir o recrutamento de

neutrófilos com consequente diminuição do dano tecidual (Barroso et al. 2012). Como já citado, estudos recentes, incluindo do nosso grupo de pesquisa, têm demonstrado alguns efeitos pró-resolutivos da Ang-(1-7), como a indução da apoptose de polimorfonucleares e do processo de eferocitose (Barroso et al. 2017a; Magalhaes et al. 2018;), a migração não flogística de monócitos/macrófagos (Zaidan et al., 2022) e a reprogramação destas células para fenótipos resolutivos (Hammer et al., 2016; Santuchi et al. 2019; Zaidan et al. 2022). A **Tabela 1** sintetiza alguns estudos que avaliam a relevância de Ang-(1-7) ou do agonista sintético de Mas, AVE0991, ou ainda ativação/deficiência de ECA2 em modelos pré-clínicos de doença.

Doença	Modelo animal	Intervenção	Efeitos	Referências
Artrite	Inflamação induzida por adjuvante em ratos e inflamação induzida por antígeno em camundongos	Administração de AVE0991	↓Infiltrado de neutrófilos ↓TNF- α e IL1- β ↓CXCL-1 ↓Hipernocicepção ↓Alterações histológicas	Da Silveira et al., 2010.
Asma	Alergia induzida por ovalbumina	Administração de Ang-(1-7)	↓Remodelamento das vias aéreas ↓Infiltrado inflamatório ↓IgE ↓IL-4 e IL-5 ↓CCL2 e CCL5 ↓P-Erk1/2, P-JNK e P-IkB- α	El-Hashim et al., 2012. Magalhães et al., 2015.
		Administração de AVE0991	↓Remodelamento das vias aéreas ↓Responsividade das vias aéreas ↓IL-5	Rodrigues-Machado et al., 2013.
Aterosclerose	Dieta rica em gordura	Superexpressão de ECA2	↓Alterações histológicas ↓CCL2 ↓MMP-3 e MMP-9	Dong et al., 2008.
	Dieta rica em gordura e animal ApoE KO	Administração de A779	↑Lípido e macrófagos ↑TNF- α e IL-6	Yang et al., 2015.
		Administração de AVE0991	↓IL-6, IL-12 e CCL2	Jawien et al., 2012.
Isquemia cerebral	Oclusão arterial induzida por ET-1	Administração de Ang-(1-7)	↓Área infartada ↓Deficiência neurológica ↓IL1- α e IL-6 ↓CXCR4 e CXCL12 ↓iNOS	Fraga-Silva et al., 2015.
	Obstrução arterial cirúrgica	Administração de Ang-(1-7)	↓Área infartada ↓Deficiência neurológica ↓TNF- α e IL-1 β ↓COX2 ↓P-IkB- α and P-NF- κ B p65	Regenhardt et al., 2013. Mecca et al., 2011.
Colite	Inflamação induzida por DDS	Administração de Ang-(1-7)	↓Gravidade da doença ↓Alterações histológicas ↓P-ERK1/2, P-p38 MAPK e P-Akt	Khajah et al., 2016.
Doença renal crônica	Diabetes induzida por STZ	Deficiência de ECA2	↑Creatinina sérica e nitrogênio derivado uréia ↑Albuminúria ↑Dano glomerular e intersticial	Shiota et al., 2010.
	Obstrução ureteral unilateral	Deficiência de ECA2	↑Dano intersticial ↑TNF- α , IL-1 β e CCL2 ↑P-IkB- α and P-NF- κ B	Liu et al., 2012.
	Camundongo diabético Akita	Administração de ECA2	↓Albuminúria ↓Alterações histológicas	Oudit et al., 2010.
	Nefropatia induzida por Adriamicina	Administração de AVE0991	↓Dano intersticial ↓TGF- β 1 ↑Clearance creatinina	Silveira et al., 2013.
	Ratos diabéticos Zucker	Administração de Ang-(1-7)	↓Proteinúria ↓TNF- α e IL-6	Giani et al., 2012.

	Camundongos diabéticos db/db	Administração de Ang-(1-7)	↓Alterações histológicas ↓Infiltrado inflamatório ↓P-STAT3	Mori et al., 2014.
	Camundongos ApoE KO	Deficiência de ECA2	↑Creatinina sérica e nitrogênio derivado de uréia ↑IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-13, IL-17A e TNF- α	Jin et al., 2015.
Falência cardíaca	Cardiomiopatia induzida por Ang II	Administração de ECA2	↑Parâmetros relacionados à função cardíaca ↓Hipertrofia cardíaca e fibrose ↓Fibronectina e TGF- β 1 ↓P-ERK1/2, P-JAK2 and P-STAT3 ↓PKC- α and PKC- β 1 ↓Estresse oxidativo	Zhong et al., 2010.
Doença pulmonar	Doença pulmonar induzida por LPS	Administração de ECA2	↓Hipertensão pulmonar ↑Oxigenação ↓TNF- α	Trembl et al., 2010.
Obesidade	Dieta rica em gordura	Superexpressão de Ang-(1-7)	↓Peso e gordura corporal ↓COX-2 ↓IL-1 β	Santos et al., 2012.
		Administração de Ang-(1-7)	↓Peso e gordura corporal ↓TNF- α e IL-6 ↓NF- κ B and P-p38 MAPK	Santos et al., 2013.

Tabela 1: Efeitos anti-inflamatórios do eixo ECA2/Ang-(1-7)/MasR em modelos animais de doenças humanas. Adaptado de Prestes et al., 2016.

1.4 Estudos de Ang-(1-7) em modelos infecciosos

No contexto de doenças infecciosas, a disfunção do SRA tem sido associada à patogênese da sepse (Zhang et al. 2014), síndrome respiratória aguda grave (um achado comum durante infecções pulmonares graves) (Imai et al. 2005) e infecção por Influenza A Vírus (IAV) (Yang et al. 2014; Zou et al. 2014). Dado o papel significativo dos componentes do SRA nas diferentes fases da inflamação - desde o início até a resolução - a ativação das vias regulatórias, da qual Ang-(1-7) participa, foi sugerida como estratégia de tratamento para diferentes doenças infecciosas. Em um modelo murino de sepse polimicrobiana induzida por ligadura e punção cecal (CLP), o tratamento com Ang-(1-7) aumentou a sobrevivência e atenuou a lesão de órgãos através do controle e restrição da hiperativação de vias de sinalização inflamatórias, como a via do NF- κ B (Tsai et al. 2018; Ng et al. 2020). De maneira interessante, a ausência do receptor Mas levou a maior frequência de macrófagos com fenótipo pró-inflamatório e secreção de citocinas durante a inflamação (Benigni, Cassis, and Remuzzi 2010; Hammer et al. 2016).

Além de modular a resposta inflamatória, Ang-(1-7) também promove defesas antimicrobianas do hospedeiro. De fato, Ang-(1-7) mostrou resgatar a

capacidade fagocitária de neutrófilos de camundongos diabéticos levando ao aumento da fagocitose de *Staphylococcus aureus* (Soto, Gaffney, and Rodgers 2019), uma importante bactéria causadora de infecções nosocomiais. Ainda nesse sentido, a inibição de ECA2 prejudica drasticamente as funções antibacterianas dos neutrófilos, aumentando a suscetibilidade a infecções bacterianas (Cao et al. 2021). De modo similar, outro estudo utilizando um modelo de infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*, revelou a dinâmica de expressão e atividade de ECA2 nos pulmões, mostrando a importância da regulação temporal desta enzima para o recrutamento de neutrófilos e a resolução da inflamação e letalidade dos animais (Sodhi et al. 2019). Ainda, um estudo recente demonstrou que Ang-(1-7), além de modular a inflamação, diminuiu a carga bacteriana nos pulmões de camundongos infectados com *Mycoplasma pneumoniae*, aumentando a morte bacteriana por macrófagos (Collins et al. 2021).

Outro aspecto importante dos efeitos pró-resolutivos da Ang-(1-7) é sua ação protetora em órgãos em diferentes contextos de doença. Em um modelo de nefropatia, o tratamento com losartana, um antagonista do receptor AT1, desvia a ativação pró-inflamatória do SRA levando à menor lesão renal (Da Silveira et al. 2013). Dadas as ações nefroprotetoras da Ang-(1-7), é possível que esse mediador possa melhorar o dano renal secundário causado pela inflamação exacerbada na sepse (Tsai et al., 2018).

A pandemia da COVID-19 colocou em evidência o papel da ECA2 durante as doenças virais. Esta enzima foi descrita como o principal receptor para o novo coronavírus (Letko, Marzi, and Munster 2020), podendo controlar tanto a infecção celular quanto as consequentes respostas inflamatórias durante a COVID-19 (Verdecchia et al. 2020). Estudos contrastantes exploraram a expressão e o papel da ECA2 durante a doença. A necropsia dos pulmões de pacientes com COVID-19 mostrou níveis aumentados da enzima ECA2 quando comparados aos pulmões de indivíduos não infectados (Ackermann et al. 2020). Além disso, níveis plasmáticos aumentados de ECA2 e Ang-(1-7) também foram encontrados em pacientes graves com COVID-19 (Reindl-Schwaighofer et al. 2021). No entanto, estudos conduzidos em outra coorte de pacientes mostrou que os níveis plasmáticos de Ang-(1-7) foram significativamente reduzidos na

COVID-19 em comparação com doadores saudáveis (Henry et al. 2021). Apesar dos dados opostos, é provável que os níveis aumentados de Ang-(1-7) em pacientes graves, sinalize uma tentativa de contrarregulação do processo inflamatório nesses pacientes.

Além da COVID-19, o papel do eixo ECA 2/Ang-(1-7)/MasR também foi avaliado no contexto de outras doenças virais, incluindo pneumonia causada por Influenza A Vírus (IAV). Pacientes infectados com IAV H7N9, uma cepa com potencial pandêmico, apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de Ang II, os quais foram correlacionados com a gravidade da doença, sugerindo a possibilidade de ser um biomarcador interessante no prognóstico desta infecção (Huang et al. 2014). Em concordância com esses achados, a deficiência de ECA2 piorou a pneumonia por IAV (causada por H7N9 e H5N1), devido às ações pró-inflamatórias do eixo Ang II/AT1R. Nesse sentido, a administração de ECA2 recombinante humana melhorou a lesão pulmonar induzida pelo H5N1 em camundongos (Yang et al. 2014; Zou et al. 2014). Ainda, estudos recentes mostraram que uma formulação oral de Ang-(1-7) reduziu a inflamação e letalidade após a infecção por IAV (H1N1) (Melo et al. 2020). Foi demonstrado que a proteção conferida pela Ang-(1-7) parece estar relacionada aos seus efeitos pró-resolutivos, ao invés de um efeito antiviral direto, e inclui a indução de apoptose de neutrófilos seguida de sua eferocitose por macrófagos (Melo et al. 2020). Ang-(1-7), ativando MasR, diminuiu de forma significativa o dano pulmonar e as cargas virais no pulmão durante a infecção aguda pelo IAV. De forma interessante, o tratamento com Ang-(1-7) reduziu a gravidade do dano pulmonar e letalidade causados por uma infecção secundária por *Streptococcus pneumoniae* (Melo et al. 2020).

Por fim, evidências crescentes apoiam o papel protetor do eixo regulador ECA2/Ang-(1-7)/MasR no contexto de doenças infecciosas, incluindo pneumonias (bacteriana e viral) e sepse. De modo geral, Ang-(1-7) e seus miméticos mostraram se capazes de aumentar os mecanismos do hospedeiro relacionados com resistência às infecções. No entanto, se faz necessário mais estudos que foquem no papel de eixo contra regulatório do SRA em outros modelos de doenças infecciosas.

1.5 Pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bastonete Gram negativo ubíquo na natureza e um patógeno oportunista em humanos. Possui diversos fatores de virulência, incluindo exotoxinas e enzimas (Fujitani, Sun, Yu & Weingarten, 2011). Além disso, é capaz de produzir um biofilme que confere resistência por exemplo, à fagocitose por leucócitos do hospedeiro (Fujitani, Sun, Yu & Weingarten, 2011). Dentre os sítios anatômicos infectados por essa bactéria, o pulmão está associado à maior taxa de mortalidade. Epidemiologicamente, a pneumonia causada por *P. aeruginosa* atinge prioritariamente, pacientes imunocomprometidos, como é o caso daqueles com fibrose cística (FC) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) levando a uma doença pulmonar hemorrágica e necrótica (Fujitani, Sun, Yu & Weingarten, 2011).

As infecções por *P. aeruginosa* geralmente estão associadas ao trato respiratório, como, por exemplo, à pneumonia. A infecção do trato respiratório compromete a integridade da barreira epitelial alveolar, levando a rápida necrose do epitélio pulmonar e disseminação da bactéria para a circulação. A resposta imune inata é essencial para o controle da infecção por *P. aeruginosa*. Essa resposta inclui a produção de mediadores inflamatórios, recrutamento celular e depuração fagocítica por neutrófilos e macrófagos (Gonçalves-de-Albuquerque *et al.*, 2016).

Os macrófagos alveolares funcionam como a primeira linha de defesa contra patógenos pulmonares, sendo importantes para coordenar a resposta inflamatória frente a infecção. Os macrófagos alveolares irão atuar na fagocitose e *killing* de *Pseudomonas aeruginosa*, no recrutamento de neutrófilos e na fagocitose de neutrófilos mortos, limitando o dano tecidual (Sainz-Mejías; Jurado-Martín & McClean, 2020). Além da fagocitose, os macrófagos alveolares e as células residentes, irão realizar o reconhecimento de alguns fatores de virulência de *P. aeruginosa* através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Como por exemplo, receptores do tipo TLR-4 e TLR-5, que são ativados por LPS e por flagelina, respectivamente. Esse reconhecimento induz ativação da via do NF-κB e induz a liberação das citocinas TNF e IL-6 e da quimiocina

CXCL1, que participa do recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (Franchi *et al.*, 2009; Sainz-Mejías; Jurado-Martín & McClean, 2020).

O recrutamento massivo de neutrófilos é uma característica importante da infecção por *P. aeruginosa*, sendo que este recrutamento se dá principalmente por ligação das quimiocinas CXC nos receptores CXCR1 e CXCR2 (Sainz-Mejías; Jurado-Martín & McClean, 2020). Uma vez recrutado para o sítio infeccioso, os neutrófilos exercem papel importante na eliminação da bactéria através da fagocitose, liberação de serina-proteases e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que atuam como bactericidas (Lavoie *et al.*, 2012; Gonçalves-de-Albuquerque *et al.*, 2016).

Dentro do ambiente hospitalar, as infecções por *P. aeruginosa* são ainda mais relevantes. Estima-se que aproximadamente 60% dos pacientes que dão entrada em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) desenvolvem uma doença infecciosa. Destas, 11% estão associadas à infecção por *P. aeruginosa*, perdendo apenas para *Klebsiella pneumoniae* (27%) e *Escherichia coli* (20%) (Choudhuri; Chakravarty; Uppal, 2017). Ainda, vale ressaltar que grande parte dos pacientes internados em UTIs recebem antibioticoterapia, dentre eles, antimicrobianos de amplo espectro (Robak *et al.*, 2018), sendo o uso desses medicamentos um dos fatores de risco para infecção hospitalar pela *P. aeruginosa* (Gomila *et al.*, 2018). Devido a tais características epidemiológicas e fisiológicas e associado ao seu perfil de resistência a múltiplas drogas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu *P. aeruginosa* na lista dos principais patógenos para os quais a descoberta de novos agentes antimicrobianos é de extrema urgência (WHO, 2017). Nesse sentido, o uso de mediadores pró-resolutivos, como Ang-(1–7), associados a terapia antimicrobiana, pode ser considerado uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções pulmonares causadas por *P. aeruginosa*.

1.6 Peritonite causada por *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bastonete Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, sendo uma bactéria comensal do trato intestinal de humanos saudáveis e muitas outras espécies animais, mas também pode causar uma ampla gama de doenças, desde diarreia a infecções extra intestinais (Kosilova *et al.*, 2020). *E. coli* é um dos isolados clínicos mais comuns em laboratórios de microbiologia e classificada em três grandes grupos: cepas comensais, cepas patogênicas intestinais e cepas patogênicas extraintestinais, de acordo com a etiologia da doença ocasionada (Kosilova *et al.*, 2020).

Peritonite significa inflamação do peritônio, cuja causa não é específica. Como a maioria das peritonites clinicamente significativas é causada por bactérias, ambos os termos são usados simultaneamente (Delibegovic *et al.*, 2007). Szeto e colaboradores (2006) demonstraram que, dentre todos os microrganismos, os da família *Enterobacteriaceae* foram as causas mais comuns de peritonite relacionada à diálise peritoneal, sendo a espécie *E. coli* mais comum. Em comparação com infecções do trato urinário, do trato respiratório ou da pele, a peritonite bacteriana é uma doença rara. No entanto, quando se desenvolve, é uma infecção grave e potencialmente fatal com envolvimento sistêmico (Szeto *et al.*, 2006).

A barreira intestinal e o sistema imunológico peritoneal são altamente desenvolvidos para prevenir infecções. A barreira entre as bactérias presentes no lúmen intestinal e a cavidade peritoneal inclui elementos físicos e funcionais e compreende: (1) O muco que cobre o epitélio intestinal, limitando o contato direto entre bactérias e células humanas, (2) o epitélio intestinal, que constitui uma barreira física e (3) o tecido linfático associado ao intestino, que protege contra transmigração bacteriana. Diferentes tipos celulares, bem como componentes funcionais, como peptídeos antimicrobianos, estão envolvidos na prevenção de infecções peritoneais (Pörner *et al.*, 2021).

A peritonite bacteriana é classificada como peritonite primária e secundária de acordo com sua patogênese (Laroche *et al.*, 1998). A peritonite primária é causada pela translocação bacteriana para a cavidade peritoneal sem

perda evidente da integridade peritoneal e ocorre predominantemente em pacientes imunossuprimidos ou crianças. Esta forma de peritonite inclui a peritonite bacteriana espontânea, observada em pacientes com cirrose, a peritonite tuberculosa, relacionada à infecção por *Chlamydia trachomatis* como observada na doença inflamatória pélvica e, em um sentido mais amplo, a peritonite relacionada à diálise peritoneal (Wittmann *et al.*, 1990). A peritonite secundária é a forma mais comum da doença e resulta de uma fonte infecciosa intra-abdominal com perda da integridade peritoneal e muitas vezes exige cirurgia. A peritonite secundária e a peritonite bacteriana espontânea são predominantemente causadas por bactérias que colonizam a mucosa intestinal, enquanto em pacientes em diálise peritoneal, as bactérias que colonizam a pele são os patógenos predominantemente encontrados (Pörner *et al.*, 2021).

A mortalidade na peritonite está relacionada à inflamação sistêmica e à sepse (Pörner *et al.* 2021). Portanto, a antibioticoterapia adequada e oportuna, assim como o emprego de moléculas pró-resolutivas que visem o controle da inflamação exacerbada envolvida na patogênese da doença, podem constituir um dos pilares terapêuticos em qualquer uma das formas de peritonite bacteriana.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo de moléculas pró-resolutivas endógenas tem chamado atenção por oferecer uma oportunidade terapêutica potencialmente superior à terapia anti-inflamatória clássica (Perretti et al. 2015), com menos efeitos colaterais e, supostamente, sem causar imunossupressão, aspecto esse importante principalmente no contexto de doenças infecciosas (Tavares et al., 2022). Pesquisas recentes demonstram que a Ang-(1-7) pode atuar como um mediador pró-resolutivo importante no contexto das inflamações agudas, atuando na diminuição da produção de mediadores e recrutamento de células inflamatórias (Da Silveira et al., 2013), induzindo a apoptose de neutrófilos e estimulando a eferocitose por macrófagos (Barroso et al. 2017), atuando na migração não flogística de monócitos/macrófagos e sua reprogramação para os perfis anti-inflamatório e pró-resolutivos (Hammer et al. 2016; Santuchi et al. 2019; Zaidan et al, 2022).

Desde a descoberta dos mediadores pró-resolutivos nos anos 90 (revisto por Serhan et al., 2011) os estudos vêm sendo conduzidos em modelos inflamatórios agudos autoresolutivos. Nos últimos anos, iniciou-se o estudo desses mediadores e da aplicabilidade dos mesmos em modelos infecciosos (Spite et al, 2009). Apesar da descrição das ações pró-resolutivas da Ang-(1-7) em modelos pré-clínicos de inflamação, tais efeitos são pouco explorados no contexto infeccioso. Levando-se em conta que a resposta inflamatória exacerbada no contexto de doenças infecciosas contribui de forma importante para os altos índices de mortalidade e que a Ang-(1-7) pode modular a inflamação, promover resolução e reparar o tecido, o estudo do eixo Ang-(1-7)/MasR pode trazer uma contribuição para o entendimento dessa via na patogênese de doenças infecciosas de difícil tratamento, como a peritonite e as infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, bem como a perspectiva de descoberta de novas abordagens terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o papel da Ang-(1-7) e do seu receptor Mas em dois diferentes contextos infecciosos: na peritonite, desencadeada pela infecção por *Escherichia coli*, e na pneumonia, causada por *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a expressão do receptor Mas em macrófagos peritoneais durante a peritonite autorresolutiva induzida por *E. coli*.

3.2.2 Avaliar o impacto da inibição do receptor Mas durante a resolução da peritonite induzida por *E. coli*, por meio da intervenção farmacológica com o antagonista A779.

3.2.3 Avaliar o impacto da deficiência genética do receptor Mas durante a resolução da peritonite induzida por *E. coli*, comparando a infecção nos animais MasR^{-/-} aos controles C57Bl/6 WT quanto aos:

- a. Parâmetros inflamatórios,
- b. Carga bacteriana dos animais infectados,
- c. Fagocitose e eferocitose.

3.2.4 Avaliar o efeito da Ang-(1-7) sobre a fagocitose e *killing* de *E. coli* e *P. aeruginosa* por macrófagos.

3.2.5 Avaliar o impacto da deficiência genética do receptor Mas na pneumonia bacteriana causada por *P. aeruginosa*, comparando a infecção nos animais MasR^{-/-} aos controles C57Bl/6 WT, quanto aos:

- a. Parâmetros inflamatórios,
- b. Carga bacteriana dos animais infectados,
- c. Eferocitose.

3.2.6 Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo Ang-(1-7) em animais infectados com *P. aeruginosa*, quanto aos:

- a. Parâmetros inflamatórios,
- b. Carga bacteriana dos animais infectados,
- c. Eferocitose,
- d. Letalidade induzida pela infecção.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT), machos, de 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e camundongos deficientes para o receptor Mas ($MasR^{-/-}$) obtidos do biotério do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Biofísica e Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG (em colaboração com o Dr Robson A.S. Santos e Dra Maria José Campagnole Santos). Os animais foram mantidos em caixas microisoladoras com no máximo 5 animais em cada sob o controle de temperatura (28 a 30°C), umidade (50%), ventilação e ciclo da luz (claro-escuro). Os animais tiveram acesso à água e ração sem restrição. Todos os experimentos foram aprovados na Comissão de Ética na utilização de animais (CEUA) sob o número de protocolo 159/2021.

4.2 Drogas e reagentes

Os peptídeos sintéticos da Angiotensina-(1-7) e do antagonista do seu receptor Mas, A779, foram adquiridos da Bachem Inc.® (Suíça). A pureza de ambos foi checada pela fabricante por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e superior a 99%.

4.3 Peritonite induzida por *E. coli*

Para a padronização do modelo de infecção peritoneal pela *E. coli* utilizamos a cepa ATCC 25922 de acordo com Chiang et al (2012). Para preparar o inóculo, a linhagem previamente armazenada a -80°C foi inoculada em ágar LB e incubada a 37°C. Após o crescimento das colônias na placa, com o auxílio de uma alça bacteriológica, colônias foram adicionadas a 10 mL de caldo LB estéril, que foi mantido na estufa a 37°C *overnight*. Após esse período, foi medida a absorbância do caldo. Para determinação da quantidade de UFC/mL presentes

no caldo, o valor de absorbância foi multiplicado por 8×10^8 conforme a equação ($\text{UFC/mL} = \text{OD}_{600 \text{ nm}} \times 8 \times 10^8$). Para a infecção, camundongos C57/BL6 ou MasR^{-/-} machos de 8 semanas de idade foram infectados intraperitonealmente com 1×10^6 UFC/200 μL de *E. coli*. Após 6, 12 e 48 horas da infecção, foi feito o lavado peritoneal com 3 mL de PBS 1X estéril e a contagem de leucócitos nos diferentes tempos. A carga bacteriana foi determinada através do plaqueamento por espalhamento de 100 μL do lavado peritoneal puro em placas de ágar MacConkey, que foram incubadas a 37°C *overnight*.

4.4 Cálculo do intervalo de resolução da peritonite induzida por *E. coli*

Camundongos C57Bl/6 WT foram infectados com 1×10^6 UFC de *E. coli* intraperitonealmente e administrados com o antagonista de MasR - A779 (200 ng/cavidade) ou veículo (PBS 1X) após 12 e 24 horas da infecção. Os intervalos de resolução foram calculados considerando o tempo em que o número de neutrófilos alcançou o valor máximo (pico da inflamação) e o tempo em que esse valor reduziu pela metade (T50), conforme Chiang et al (2020).

4.5 Obtenção e diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs)

Camundongos C57/Bl6 e MasR^{-/-} foram eutanasiados e as tíbias e o fêmures retirados para coleta da medula óssea. O interior dos ossos foi lavado com auxílio de uma seringa contendo meio de cultura DMEM a fim de remover a medula óssea. A suspensão celular obtida foi então centrifugada por 1200 rpm, durante 5 minutos. O pellet foi ressuspenso em meio de condicionamento e diferenciação completo (DMEM acrescentado de 10% de soro fetal bovino inativado e 30% de sobrenadante de cultura de células L929) e o conteúdo transferido para garrafas de cultura médias, que foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂. Após sete dias em cultura, o sobrenadante foi removido e os macrófagos aderentes removidos das garrafas com o auxílio de *cell scrapers* e plaqueados para os ensaios de fagocitose e *killing*.

4.6 Ensaio de fagocitose e *killing*

2×10^5 macrófagos peritoneais ou macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) obtidos através de animais *naive*, foram plaqueados e incubados com *E. coli* (MOI 1:10) durante 3 horas para avaliar a fagocitose (1 hora de adesão a 4°C, seguida da incubação da placa a 37°C por 2 horas). As bactérias não internalizadas foram retiradas após a lavagem do poço com gentamicina (5 µg/mL em PBS, 30 minutos). Para a contagem das bactérias fagocitadas, os macrófagos foram lisados com água de injeção, seguida da adição de PBS 10X para interromper o processo. As bactérias internalizadas viáveis foram contadas em placas de ágar MacConkey. O mesmo protocolo foi utilizado para o ensaio de fagocitose de *P. aeruginosa*, porém foram utilizados também macrófagos alveolares (linhagem AMJ2.C11). O tratamento com Ang-(1-7) (100 nM por poço) foi realizado uma hora antes da adição das bactérias. Para o ensaio de *killing*, os macrófagos foram incubados por mais 2 horas após a adição de gentamicina ao poço. As células foram então lisadas e as bactérias viáveis foram contadas como descrito anteriormente. O percentual de *killing* foi calculado como: % de bactérias mortas = $100\% - [(UFC \text{ de bactérias viáveis recuperadas no ensaio de } killing / \text{ média de UFC de bactérias internalizadas no ensaio de fagocitose}) \times 100]$.

4.7 Ensaio de eferocitose *in vitro* e *in vivo*

Neutrófilos isolados do sangue de doadores saudáveis foram incubados com 10 µM de Staurosporina por uma hora para indução da apoptose. Para o ensaio *in vitro*, os neutrófilos apoptóticos foram marcados com 5 µM CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) a 37°C e 5% CO₂ durante 1 hora. Após isso, foram colocados em co-cultura com BMDMs provenientes de animais WT e MasR^{-/-}, na proporção de três neutrófilos apoptóticos para cada macrófago. A avaliação da eferocitose foi feita através de citometria de fluxo (MFI de células duplo-positivas para CFSE e F4/80). *In vivo*, os animais WT e MasR^{-/-} foram previamente desafiados intraperitonealmente com Zymosan (0,1 mg/animal). Após 71 horas do desafio, os neutrófilos apoptóticos foram injetados na cavidade peritoneal, na mesma proporção descrita acima. Uma hora após a

injeção, foi feito o lavado peritoneal e a eferocitose foi obtida pela contagem de lâminas preparadas por citospin coradas com o kit Panótico. 500 células foram contadas em cada lâmina. O resultado foi expresso como a porcentagem de macrófagos contendo neutrófilos apoptóticos internalizados.

4.8 Pneumonia induzida por *P. aeruginosa*

Para a padronização do modelo de infecção pulmonar pela *P. aeruginosa* utilizamos a cepa PAO1 (Sodhi et al., 2019). Para preparar o inóculo, a linhagem previamente armazenada a -80°C foi inoculada em ágar LB e incubada a 37°C *overnight*. Após o crescimento das colônias na placa, com o auxílio de uma alça bacteriológica, colônias foram adicionadas a 25 mL de caldo LB estéril, que foi mantido na estufa a 37°C *overnight*. Após esse período, foi medida a absorbância do caldo. A OD de 0,5 a 600 nm corresponde de 1×10^9 a 3×10^9 UFC/mL. Para a infecção, camundongos C57/BL6 ou MasR^{-/-} machos de 8 semanas de idade foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e infectados pela via intranasal com 10^6 UFC/40µL. Para o experimento de cinética de inflamação, os animais foram eutanasiados 8, 24 e 48 horas após a infecção para análise dos parâmetros inflamatórios e carga bacteriana no lavado broncoalveolar e pulmão.

4.9 Lavado broncoalveolar (BAL)

O BAL foi realizado para obter leucócitos presentes nos espaços alveolares. A traqueia foi exposta e um cateter de polietileno de 1,7 mm de diâmetro externo foi inserido. O BAL foi realizado pela instilação de duas alíquotas de 1 mL de PBS 1X estéril. O número total de leucócitos foi determinado por contagem de leucócitos em uma câmara de Neubauer após a coloração com corante de Turk. Contagens diferenciais foram obtidas por preparações de Cytospin e posterior avaliação da porcentagem de cada leucócito em uma lâmina corada por May-Grunwald-Giemsa utilizando critérios morfológicos padrão para cada tipo celular (Piaton et al. 2015).

4.10 Determinação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. aeruginosa* no BAL e no pulmão de animais infectados

Foi quantificada a carga bacteriana no BAL e no pulmão dos animais em diferentes tempos pós infecção. 100 μ L das amostras puras e diluídas na proporção de 1:10 em solução salina, foram plaqueados por espalhamento em placas de ágar MacConkey. As placas foram incubadas por 24h a 37°C e então o número de unidades formadoras de colônia foi determinado.

4.11 Avaliação da expressão do receptor Mas e da proteína Anexina A1 por *Western Blot*

4.11.1 Obtenção dos extratos protéicos

Células obtidas do lavado pleural e peritoneal foram lavadas com PBS 1X e lisadas pela adição de 200 μ L de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1 mM de NaVO₃, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 200 mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina) mantidas em banho de gelo por 15min. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10.000 RPM em microcentrífuga por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante aliqotado e guardado à -20°C até o momento de uso.

4.11.2 Quantificação de proteínas totais nas amostras obtidas

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

absorbâncias das amostras foram comparadas com as absorbâncias da curva padrão, e as concentrações calculadas e expressas em mg/mL (ou µg/µL).

4.11.3 Fracionamento eletroforético e transferência

Os extratos protéicos totais foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão LB 5X (10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250 M Tris/HCl pH 6,8) e a mistura mantida a 100°C por 5 minutos. Os extratos protéicos foram fracionados em gel de 10% de poliacrilamida/SDS. Ao final da corrida, foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECL™, GE Healthcare) e coradas com o reagente Ponceau para verificação do padrão de transferência. Posteriormente, a membrana foi lavada 5x com a solução de PBS/Tween 0,1% até que o corante fosse totalmente eliminado.

4.11.4 Immunoblot e revelação

As membranas foram bloqueadas com PBS/Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado por uma hora. Em seguida, elas foram lavadas com PBS/Tween e, incubadas com o anticorpo de interesse a 4°C overnight. Após novas lavagens com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente com o respectivo anticorpo secundário ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL™ (GE Healthcare) e expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL™, GE Healthcare). O filme foi revelado utilizando-se revelador e fixador (Kodak), conforme indicações do fabricante. Os anticorpos utilizados foram: anti-MasR 1:500 (Abcam), anti-AnxA1 1:3000 (Invitrogen) e anti-β-actina 1:10000 (Sigma Aldrich) e anticorpos secundários conjugados com peroxidase – anti-rabbit 1:3000 (Cell Signaling) e anti-mouse 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology). As análises densitométricas foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

4.12 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

Os sobrenadantes do lavado peritoneal e do BAL bem como o pulmão e plasma dos animais infectados respectivamente, por *E. coli* e *P. aeruginosa*, foram utilizados para a dosagem das citocinas e quimiocinas. Para obtenção do extrato de tecido, amostras de pulmão foram homogeneizadas numa solução de extração de citocinas (PBS contendo NaCl, Tween 20, BSA, PMFS, Cloreto de Benzetônio, EDTA e aprotinina) na proporção de 0,1 g de tecido para cada 1 mL de solução, utilizando-se o homogeneizador TissueLyser LT (QUIAGEN, Alemanha). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos a -20°C, para posterior análise. No sobrenadante do lavado peritoneal foi dosada apenas a quimiocina CCL2. Já no sobrenadante do BAL e amostras de pulmão processado, foram dosados CXCL1, IL-1 β , TNF- α , IL-6, CCL2 e IL-10. O protocolo utilizado foi estabelecido no kit de ELISA murino da R&D Systems, em placa de 96 poços. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS 1X, e adicionados à placa de 96 poços para que a sensibilização ocorresse *overnight* à 4° C. No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes e, em seguida, foi realizado o bloqueio com 1% de albumina bovina diluída em PBS por 2 horas à temperatura ambiente, para evitar a ligação inespecífica durante o ensaio. Após o bloqueio, a placa foi lavada e 50 μ L de cada uma das amostras foram adicionados em cada poço e as placas incubadas *overnight*. No dia seguinte, após a lavagem, os anticorpos de detecção (diluídos em 0,1% de BSA/PBS) foram adicionados à placa e esta incubada por duas horas à temperatura ambiente. A detecção foi realizada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingen” - 1:4.000) e revelada com o substrato OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride - Sigma) com 0,006% peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄ 1 M. A leitura foi feita no espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) com filtro para um comprimento de onda de 490 nm. A cor obtida pela reação é diretamente proporcional à concentração da citocina na amostra analisada. As absorbâncias obtidas pela leitura foram comparadas a uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina analisada, fornecida no kit.

4.13 Análise histológica

O pulmão foi isolado e imerso em formol tamponado a 10% para fixação durante 48 horas. Em seguida, os tecidos foram desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 5 milímetros de espessura foram dispostos em lâminas de microscopia e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para diferenciação de porções basófilas e acidófilas e categorização comparativa da inflamação. A análise histopatológica foi realizada após o exame das lâminas ao microscópio por um patologista experiente, de forma cega ao desenho experimental. O escore histopatológico foi realizado com base em Hovart JC et al., 2007 avaliando: a inflamação nas vias aéreas e nos vasos - 0 (ausente) a 4 (grave); inflamação no parênquima - 0 (ausente) a 5 (muito grave); e infiltrado de PMN - 0 (ausente) a 5 (muito grave). Sendo 0 o escore mínimo e 14 o escore máximo.

4.14 Análise estatística

Dados foram analisados por *One-way* ANOVA, seguido do teste de Newman Keuls ou *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparações de múltiplas variantes (ex: diferença entre os backgrounds e presença de infecção) ou teste de Tukey (diferença entre os intervalos de tempo). Quando a comparação era realizada apenas entre dois grupos, foi utilizado Teste t de Student. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM (*standard error of the mean* - erro padrão da média). As análises estatísticas foram feitas utilizando o GraphPad Software 8.0.

5 RESULTADOS ALCANÇADOS

5.1 Resultados pertinentes ao modelo de infecção por *E. coli*

5.1.1 O antagonismo do receptor Mas (MasR) com A779 impede a resolução da inflamação em um modelo de peritonite induzido por *E. coli*

Para avaliar o papel de MasR em modelos infecciosos, realizamos experimentos utilizando um modelo autorresolutivo de peritonite induzido pela bactéria Gram-negativo *Escherichia coli* (Chiang et al. 2012). Inicialmente, verificamos a expressão do MasR em macrófagos obtidos do peritônio e pudemos observar que a expressão de MasR aumentou na fase resolutive da inflamação (48h) da peritonite induzida por *E. coli* (**Figura 4A**). Posteriormente, foi realizado o bloqueio de Mas com o antagonista A779, o qual foi administrado durante o pico da inflamação (12h) com uma injeção adicional no tempo de 24h e eutanásia dos animais após 48h. As células da cavidade peritoneal foram então coletadas para determinação dos índices de resolução. Observou-se que o bloqueio de MasR no pico da inflamação atrasou significativamente a resolução da inflamação neutrofílica durante a peritonite, conforme evidenciado pelo aumento do intervalo de resolução ($R_i = 22h$ no grupo do veículo *versus* $R_i > 48h$ no grupo tratado com A779 - **Figura 4B**).

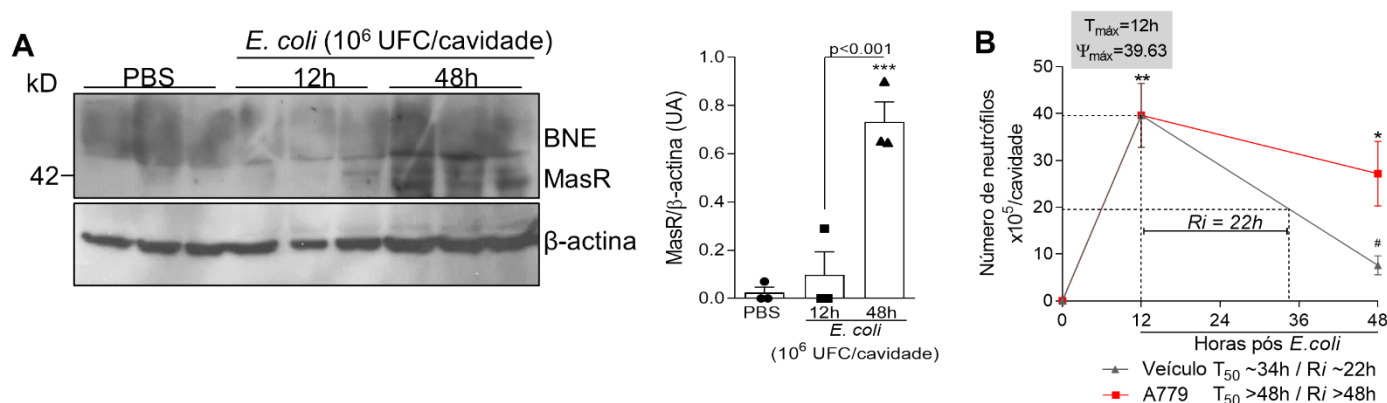


Figura 4: A inibição de MasR impede a resolução da peritonite induzida por *E. coli*. Camundongos WT foram infectados com *E. coli* (1×10^6 UFC) e os macrófagos da cavidade peritoneal foram recolhidos em 12h e 48 h pós-infecção para avaliação da expressão de MasR por Western Blot (A, $n = 3$). Macrófagos de camundongos injetados com PBS foram usados como controles. Camundongos infectados com *E. coli* (1×10^6 UFC) foram administrados com A779 (200 ng/cavidade – 12 e 24h após infecção) ou veículo e os números de neutrófilos em 12 e 48 h pós-infecção foi avaliado para calcular os intervalos de resolução (R_i - B). T_{50} = tempo em que os números de neutrófilos reduzem para 50% do máximo ($n=7$). Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle (PBS), ou # para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com A779, por One-way ANOVA.

5.1.2 A deficiência genética do receptor Mas compromete o recrutamento de células mononucleares para a cavidade peritoneal durante a fase resolutive da peritonite induzida por *E. coli* e o clearance bacteriano

A fim de validar o papel de Mas durante a infecção, utilizamos animais deficientes no receptor ($MasR^{-/-}$). Assim, animais WT e $MasR^{-/-}$ foram infectados intraperitonealmente com *E. coli* (10^6 UFC/animal) e avaliados em diferentes momentos pós-infecção. Aqui, podemos verificar que a deficiência de MasR prejudicou o recrutamento de macrófagos durante a fase resolutive da peritonite induzida por *E. coli*, sem alterar a cinética de recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal (**Figura 5A**). Os números reduzidos de macrófagos foram associados a uma redução significativa dos níveis de CCL2 durante a infecção (**Figura 5C**) e contagens bacterianas mais altas nos camundongos $MasR^{-/-}$ em comparação com os WT (**Figura 5D**).

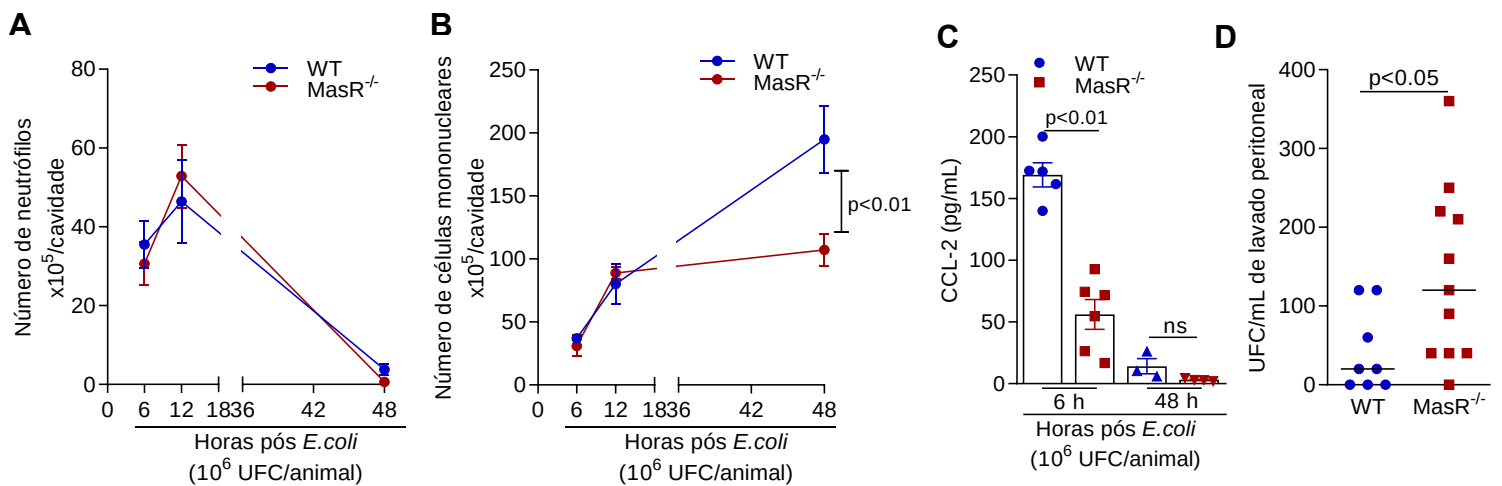


Figura 5: Animais $MasR^{-/-}$ apresentam menor recrutamento de monócitos/macrófagos e menor clearance bacteriano. Camundongos WT e $MasR^{-/-}$ foram infectados com *E. coli* (1×10^6 UFC), e o número de neutrófilos (A) e monócitos/macrófagos (B) foram avaliados em diferentes momentos pós-infecção. Os níveis de CCL2 foram medidos nos sobrenadantes das lavagens peritoneais em 6 e 48 h pós-infecção (C). O gráfico (D) mostra os números de UFC na lavagem às 6 h pós-infecção ($n=5-11$). Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Foi utilizado one-way ANOVA (para comparação de mais de dois grupos) ou teste t (ao comparar dois grupos).

5.1.3 O peptídeo angiotensina (1-7) induz a fagocitose de *E. coli* por macrófagos

Para avaliar se o eixo Ang-(1-7)/MasR afetaria a capacidade dos macrófagos de fagocitar bactérias, macrófagos peritoneais de animais WT *naive* ou MasR^{-/-} foram isolados. 2x10⁵ células de cada grupo foram plaqueadas para um ensaio de fagocitose *ex vivo*. Podemos observar que a fagocitose de *E. coli* foi prejudicada pela deficiência de MasR (**Figura 6A**). Em concordância com esses resultados, o tratamento de BMDMs de camundongos WT com Ang-(1-7) aumentou significativamente a taxa de fagocitose *in vitro* (**Figura 6C**). O tratamento com Ang-(1-7) não modificou o *killing* bacteriano relacionado aos macrófagos (**Figura 6E**). Em conclusão, Ang-(1-7)/MasR é importante para a fagocitose de bactérias, mas não parece afetar significativamente os mecanismos de morte de patógenos em macrófagos. Assim, as cargas de bactérias mais altas observadas *in vivo* em camundongos MasR^{-/-} em comparação com WT (evidenciada na **Figura 5D**) são, provavelmente, devido à diminuição da fagocitose de bactérias o que, ao longo do tempo, leva a um atraso no *clearance*.

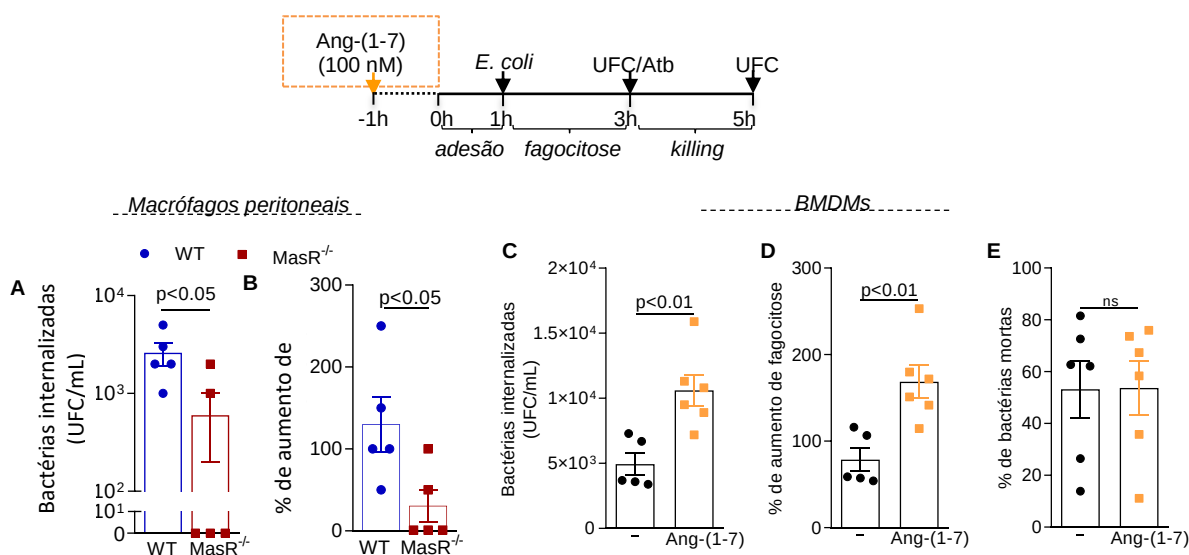


Figura 6: O tratamento com Ang-(1-7) promove a fagocitose de *E. coli* *in vitro*. A fagocitose de *E. coli* foi avaliada em macrófagos peritoneais de animais WT e MasR^{-/-} (A e B) e BMDMs pré-tratados com Ang-(1-7), 100 nM (C, D e E). Os resultados são expressos como UFC de bactérias internalizadas ou % de fagocitose (n=5-6). Em um experimento paralelo, para avaliação do *killing* pelos macrófagos, as células foram incubadas por mais 2 horas pós antibiótico para avaliar a morte de bactérias internalizadas (E). Os dados são apresentados como média ± SEM. Foi utilizado teste t ao comparar dois grupos. Os valores de p são mostrados na figura.

5.1.4 O eixo *Ang-(1-7)/MasR* está envolvido na eferocitose de neutrófilos apoptóticos *in vivo* e *in vitro*

A eferocitose é um dos eventos chave na resolução da inflamação (Dalli & Serhan 2017). Já foi demonstrado que *Ang-(1-7)* promove eferocitose de neutrófilos apoptóticos e de eosinófilos (Barroso et al. 2017; Magalhaes et al. 2018). No entanto, os mecanismos associados permaneceram desconhecidos. Para compreender melhor esses mecanismos, realizamos um ensaio de eferocitose *in vivo*, no qual camundongos WT e *MasR*^{-/-} foram desafiados previamente com Zymosan. Decorridas setenta e uma horas do desafio, neutrófilos apoptóticos foram injetados na cavidade peritoneal de ambos os animais. Após uma hora, as células presentes na cavidade foram coletadas e analisadas por microscopia para contagem da eferocitose. Posteriormente, realizamos o ensaio de eferocitose *in vitro*, em que BMDMs de animais WT e *MasR*^{-/-} foram colocados em co-cultura com neutrófilos humanos apoptóticos marcados com CFSE. Em seguida, as células foram lavadas e marcadas com F4/80 e analisadas por citometria de fluxo. Os dados da **Figura 7** mostram que animais *MasR*^{-/-} apresentam menores taxas de eferocitose *in vivo* e *in vitro*.

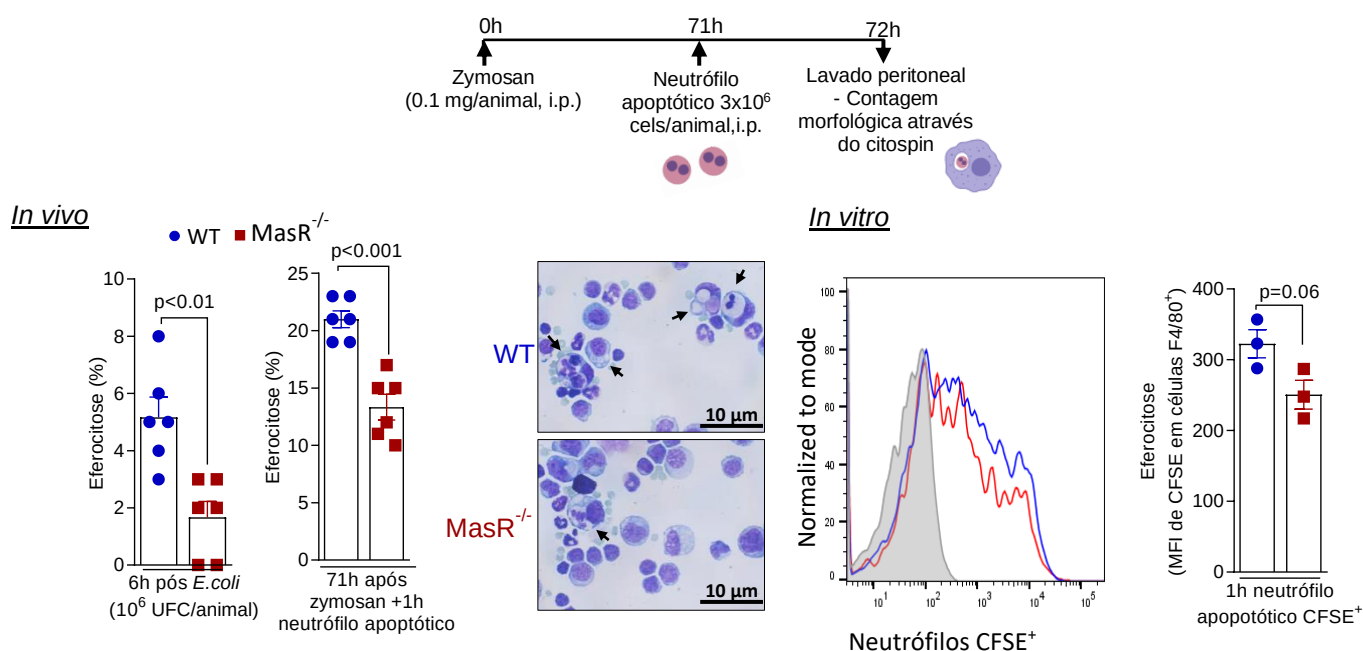


Figura 7: O receptor *MasR* é importante para a eferocitose de neutrófilos apoptóticos. Camundongos WT e *MasR*^{-/-} foram infectados com *E. coli* intraperitonealmente (1×10^6 UFC/animal) (A) ou desafiados com Zymosan, (0.1 mg/Kg) (B) e a eferocitose foi morfológicamente avaliada em preparações de citospin. A frequência de eferocitose foi obtida pela contagem de 500 células por lâmina. As imagens representativas das lâminas são mostradas na figura C. Para avaliação *in vitro*, neutrófilos foram isolados de doadores saudáveis

e tratados com estaurosporina (10 μ M) por uma hora para indução da apoptose. As células foram marcadas com CFSE e colocadas em co-cultura com BMDMs provenientes de animais WT e MasR^{-/-} por uma hora. A porcentagem de eferocitose foi obtida através da análise por citometria de fluxo (MFI de CFSE em macrófagos) (D-E). Resultados são mostrados como média $\pm$ SEM. n = 4-6 animais em cada grupo.

Em suma, utilizando o modelo de peritonite induzido por *E. coli*, demonstramos que o receptor Mas é expresso durante o curso da infecção e sob o antagonismo farmacológico de Mas com A779 ocorre uma falha na resolução natural da inflamação, caracterizado pelo acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal. Além disso, utilizando animais com deficiência gênica em Mas, embora a resolução neutrofílica aconteça de forma semelhante aos animais WT, há um menor recrutamento monócitos/macrófagos para o peritônio associado com menores níveis de CCL2 e menor porcentagem de eferocitose. Em animais deficientes para o receptor Mas, podemos observar um aumento significativo da carga bacteriana no lavado peritoneal, e macrófagos deficientes em MasR apresentam menores taxas de eferocitose de *E. coli*. Em consonância, macrófagos tratados com o agonista de Mas – o peptídeo Ang-(1-7) - aumenta a fagocitose, evidenciando a importância do eixo MasR/ Ang-(1-7) para fagocitose e *clearance* de bactérias.

5.2 Resultados pertinentes ao modelo de infecção por *P. aeruginosa*

5.2.1 A infecção por *P. aeruginosa* induz uma resposta inflamatória exacerbada nos pulmões marcada por intenso infiltrado neutrofílico

Após elucidarmos a participação do eixo Ang-(1-7)/MasR em um modelo autorresolutivo de peritonite induzido por *E. coli*, nosso próximo objetivo foi caracterizar melhor a participação desse eixo utilizando um modelo infeccioso mais grave e de grande importância clínica: a pneumonia induzida por *Pseudomonas aeruginosa*. A cinética da resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *P. aeruginosa* (10^6 UFC por animal) foi avaliada nos tempos de 8, 24 e 48 horas após a infecção. Como podemos observar na **Figura 8A**, a infecção leva a um recrutamento intenso de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. Embora não ocorra diminuição do número de neutrófilos ao longo do tempo, a porcentagem de células apoptóticas aumenta consideravelmente após 24 e 48 horas (**Figura 8B**), assim como o percentual de eferocitose (**Figura 8C**). O nível de mediadores pró-inflamatórios (TNF α , IL6, IL1 β e CXCL1) atingiu seu pico 8 horas após a infecção, diminuindo nos tempos de 24 e 48 horas após a infecção. Como podemos observar na **Figura 8A**, a infecção leva a um recrutamento intenso de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. Embora não ocorra diminuição do número de neutrófilos ao longo do tempo, a porcentagem de células apoptóticas aumenta consideravelmente após 24 e 48 horas (**Figura 8B**), assim como o percentual de eferocitose (**Figura 8C**). O nível de mediadores pró-inflamatórios (TNF α , IL6, IL1 β e CXCL1) atingiu seu pico 8 horas após a infecção, diminuindo nos tempos de 24 e 48 horas (**Figuras 8D e E**). De modo semelhante, a carga bacteriana no BAL e nos pulmões também foi maior no tempo de 8 horas (**Figuras 8F e G**). De forma interessante, podemos observar que o receptor Mas está aumentado nos tempos de 24 e 48 horas, onde se inicia a resolução da inflamação neste modelo. Associado a isso, observa-se o aumento de Anexina A1 (**Figura 8H**), um mediador pró-resolutivo já avaliado em outros modelos de pneumonia (Tavares et al. 2014).

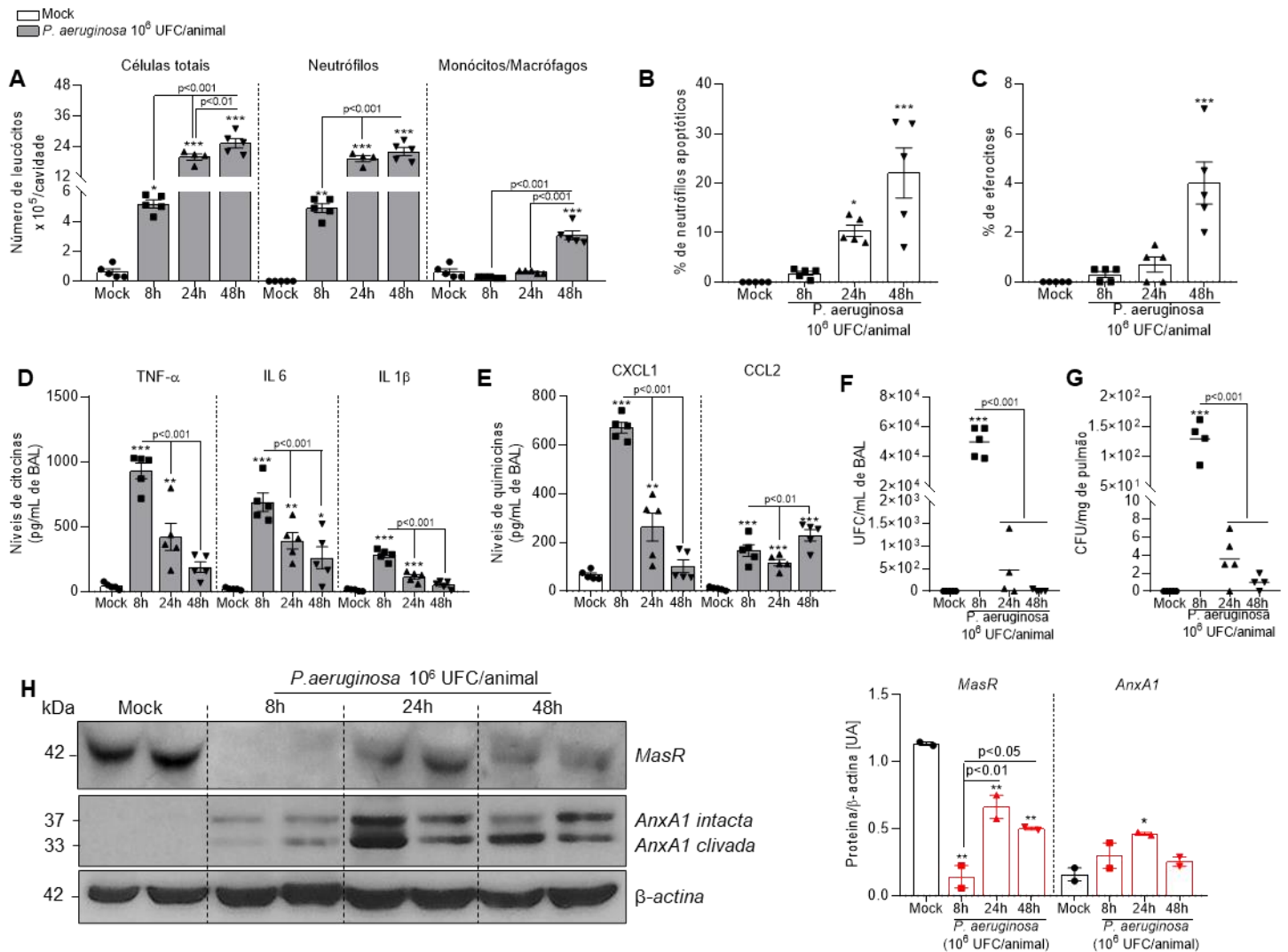


Figura 8: Cinética da resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *P. aeruginosa*.

Camundongos foram instilados com PBS (Mock) ou *P. aeruginosa* (10⁶ UFC, intranasal), n = 5 animais em cada grupo. Diferentes tempos após a infecção, foram avaliados o número de leucócitos totais, neutrófilos e macrófagos (A), o percentual de células apoptóticas (B) e de eferocitose (C) no lavado broncoalveolar (BAL) dos animais. Os níveis de citocinas (TNF- α , IL6 and IL1 β) (D) e quimiocinas no BAL (CXCL1 and CCL2) (E) foram mensurados por ELISA. A carga bacteriana foi avaliada no BAL (F) e nos pulmões dos animais infectados (G). A expressão do receptor Mas e da proteína Anexina A1 nas células do lavado broncoalveolar foram avaliadas por Western Blot (H). β -actina foi utilizada como controle das quantidades de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas. A densitometria foi feita utilizando o software ImageJ. Resultados são expressos como média $\pm$ SEM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 quando os animais infectados são comparados ao grupo mock.

5.2.2 Animais deficientes para o receptor Mas ($MasR^{-/-}$) apresentam exacerbação da inflamação em um modelo de pneumonia induzida por *P. aeruginosa*

Tendo em vista a participação do receptor Mas, no modelo de peritonite induzida por *E. coli*, nosso próximo objetivo foi estabelecer o papel deste receptor no modelo de pneumonia causada por *P. aeruginosa* (cepa PAO1). Para isso, utilizamos o inóculo padronizado nesse trabalho (**Figura 8**) e bem estabelecido na literatura (Sodhi et al. 2019). Para tal, animais WT e $MasR^{-/-}$ foram infectados por via intranasal com 10^6 UFC de PAO1 e eutanasiados 24 horas após a infecção. Como demonstrado na **Figura 9A**, observamos um maior número de leucócitos no BAL dos animais $MasR^{-/-}$ em comparação aos animais WT infectados, sendo que esse influxo foi constituído majoritariamente por neutrófilos. Embora a quantidade de monócitos/macrófagos recrutados neste modelo seja de apenas 10% dos leucócitos totais, observou-se um menor número dessas células nos animais $MasR^{-/-}$ comparados aos WT. De forma interessante, foi observada menor eferocitose de neutrófilos apoptóticos (**Figura 9B**) e maior recuperação da carga bacteriana no lavado broncoalveolar de animais deficientes para o receptor Mas (**Figura 9C**). Podemos notar que os animais $MasR^{-/-}$ apresentaram maiores níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 β , e da quimiocina CXCL-1 no BAL (**Figuras 9D e E**) e no pulmão (**Figuras 9F e G**) durante a pneumonia induzida por *P. aeruginosa*. De forma interessante, os níveis de CCL2 e IL-10 foram menores nos animais $MasR^{-/-}$, tanto no BAL, quanto nos pulmões (**Figuras 9E e G**). Associado a esses achados, animais $MasR^{-/-}$, apresentam menores níveis da proteína Anexina A1 intacta (**Figura 9H**).

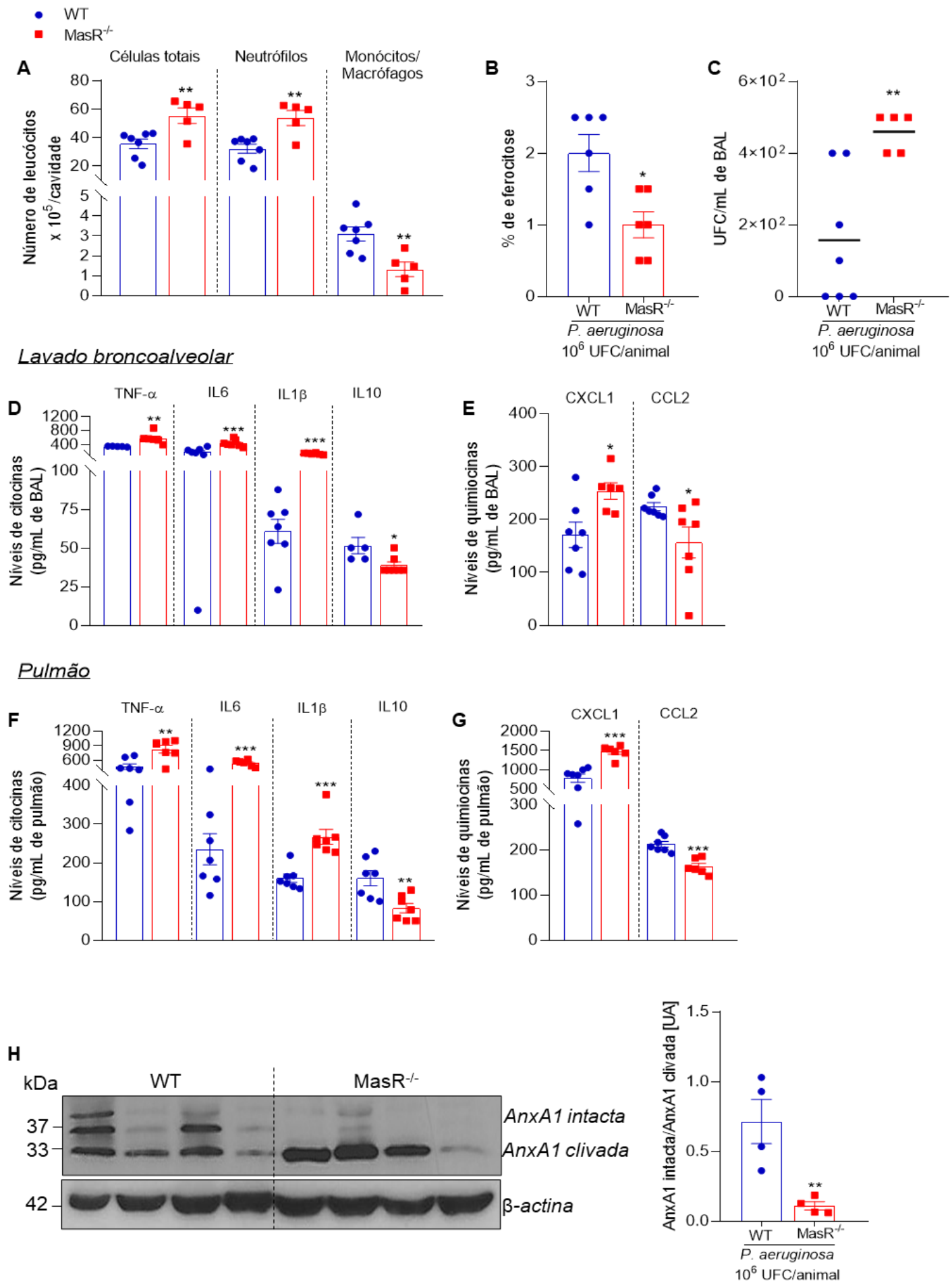


Figura 9: Os animais MasR^{-/-} apresentam exacerbação da inflamação pulmonar desencadeada pela infecção por *P. aeruginosa*. Camundongos WT e MasR^{-/-} foram infectados com *P. aeruginosa* (n = 6-7 animais em cada grupo) por via intranasal (10⁶ UFC/animal) e após 24h, o BAL foi coletado para contagem total e diferencial de células (A), contagem de eferocitose (B) e quantificação da carga bacteriana no lavado broncoalveolar (C). Os níveis de citocinas (TNF- α , IL6 and IL1 β) e quimiocinas (CXCL1, CCL2 e IL10) no BAL (D e E) e nos pulmões (F e G) foram mensurados por ELISA. A expressão da proteína Anexina A1 nas células do lavado broncoalveolar foi avaliada por Western Blot (H). β -actina foi utilizada como controle. A densitometria foi feita utilizando o software ImageJ. Resultados são expressos como média $\pm$ SEM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0.001 quando os animais WT são comparados aos MasR^{-/-}.

5.2.3 Animais WT e MasR^{-/-} apresentam dano pulmonar semelhante após a infecção por *P. aeruginosa*

Sabendo que a infecção por *P. aeruginosa* leva a um intenso recrutamento de leucócitos, composto majoritariamente por neutrófilos, e que animais MasR^{-/-} demonstram uma exacerbação desse processo, nosso próximo objetivo foi investigar o dano pulmonar causado pela infecção nesses animais. Para isso, camundongos WT e MasR^{-/-} foram infectados com 10⁶ UFC, por via intranasal e após 24 horas eutanasiados para coleta do BAL e dos pulmões, sendo o lobo esquerdo reservado para as análises histopatológicas. Podemos observar que no tempo analisado, ambos os animais atingem um platô máximo de *score* de dano histológico, compatível com pneumonia grave, e caracterizada por intenso infiltrado neutrofílico alveolar, parenquimal e vascular. Por esse motivo, acreditamos que não foi possível observar piora do *score* nos animais deficientes para o receptor Mas (**Figuras 10A e B**). Embora o dano histológico seja semelhante em ambos os genótipos, foi observado uma tendência dos animais MasR^{-/-} apresentarem maior quantidade de proteínas no BAL, o que pode estar relacionado a um edema mais grave nesses animais (**Figura 10C**).

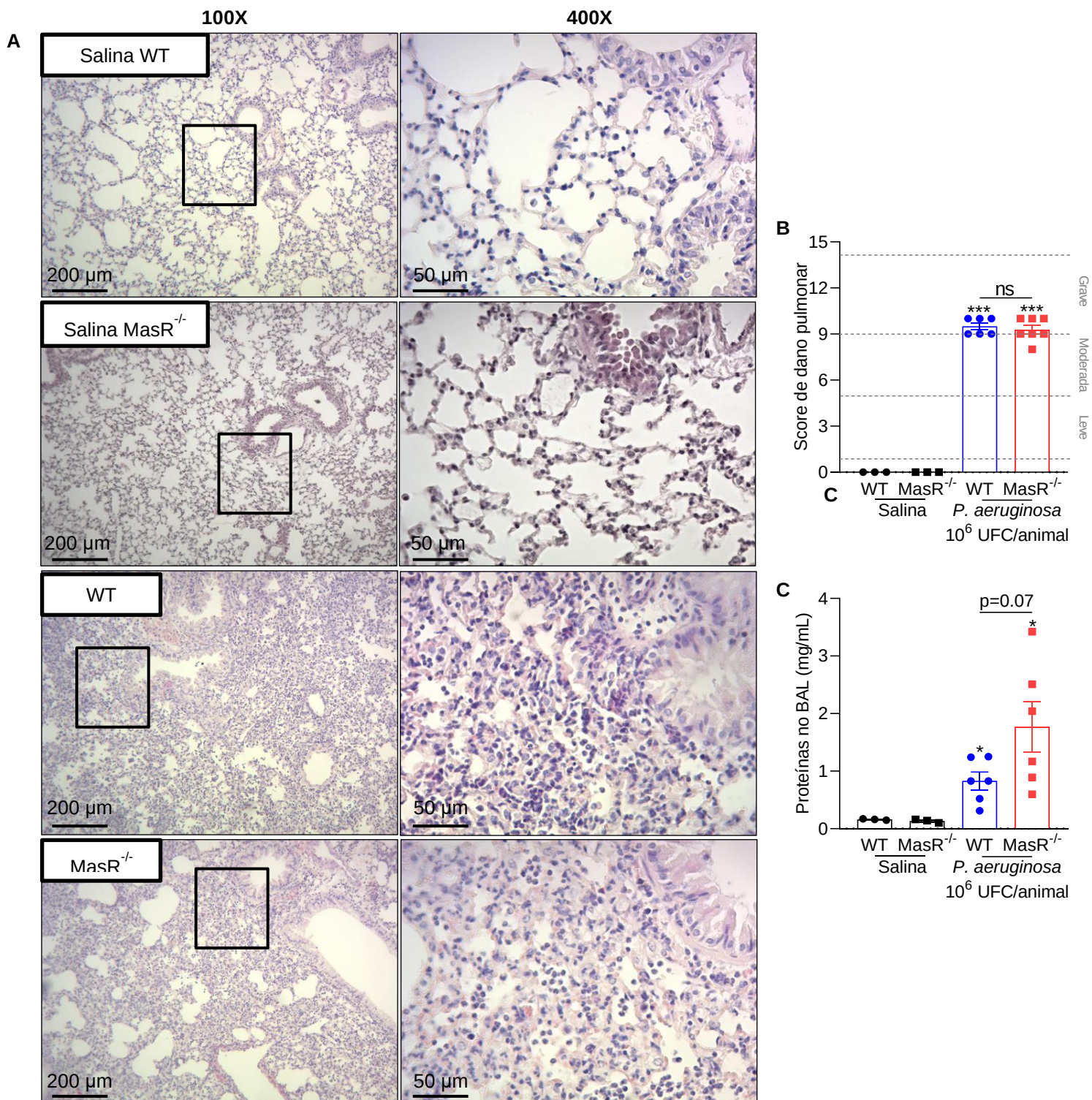


Figura 10: Os animais MasR^{-/-} apresentam dano pulmonar semelhante aos animais WT. Camundongos WT e MasR^{-/-} foram infectados com *P.aeruginosa* por via intranasal (10⁶ UFC/animal) e após 24h, os pulmões foram coletados para análise histológica (n= 3-6 animais em cada grupo). Imagens representativas de pulmões corados por Hematoxilina e Eosina (H&E) são mostradas em (A). Escala = 200 μ m (ampliação menor) e 50 μ m (ampliação maior). Imagens da direita representam ampliações maiores (400X) das áreas selecionadas (caixas) nas imagens da esquerda (100X). O escore histopatológico avaliou inflamação das vias aéreas, vascular e parenquimatosa, infiltração neutrofílica e lesão epitelial (B). O nível de proteínas do BAL também foi avaliado (C). Resultados são expressos como média $\pm$ SEM. *p<0.05 e ***p<0.001 quando se compara os grupos WT e MasR^{-/-} infectados aos seus respectivos grupos salina.

5.2.4 O tratamento com Ang-(1-7) atenua a resposta inflamatória durante a pneumonia induzida por *P. aeruginosa*

Considerando os achados anteriores que demonstram a importância do receptor Mas no modelo de pneumonia induzida por *P. aeruginosa*, nosso próximo objetivo foi avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo Ang-(1-7) sobre alguns parâmetros inflamatórios de animais infectados como: recrutamento de leucócitos e perfil de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Para isso, animais C57/Bl6 WT foram infectados com 10^6 UFC e após 24 horas, um grupo foi tratado com veículo (NaCl 0,9%, 200 μ L), e o outro, com Ang-(1-7) (30 μ g em 200 μ L, i.p.), conforme descrito na literatura (Collins et al. 2021; Zhu et al. 2021). Após 48 horas da infecção, os animais foram eutanasiados para obtenção do BAL. Foi adotado uma estratégia de tratamento com 24h após infecção, dado a cinética de expressão do receptor Mas, que aumenta nos tempos de 24 e 48 horas após a infecção (**Figura 8H**). Desse modo, optamos por tratar os animais num período de tempo em que o receptor estivesse expresso nas células.

Podemos observar que o tratamento com o peptídeo reduziu o recrutamento de leucócitos, principalmente de neutrófilos (**Figura 11A**) para o espaço alveolar. Utilizando este protocolo de tratamento não foi possível observar redução da carga bacteriana no BAL e no pulmão (**Figura 11C**), uma vez que nesse intervalo de tempo já não mais se detecta bactéria nesses espaços (**Figura 8F e 8G**). No entanto, quando o tratamento foi realizado 12h pi e o lavado com 24 horas, Ang-(1-7) foi capaz de reduzir a carga bacteriana no lavado broncoalveolar dos animais infectados com *P. aeruginosa* (dados não mostrados). De forma interessante, a porcentagem de eferocitose de neutrófilos apoptóticos tende a ser maior no grupo tratado com Ang-(1-7), comparando os grupos veículo e tratado (**Figura 11B**), o que contribui para resolução da inflamação.

Após a avaliação do efeito do tratamento com Ang-(1-7) sobre o recrutamento de leucócitos e carga bacteriana de animais infectados com *P. aeruginosa*, avaliamos o perfil de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e quimiocinas (CXCL1 e CCL2) no BAL, pulmão e plasma dos animais. O tratamento com Ang-

(1-7) foi capaz de reduzir, no BAL, IL-6 e CXCL1 (**Figura 11D e E**), no pulmão, TNF- α (**Figura 11F**) e no plasma, IL-1 β e CXCL1 (**Figura 11H e I**).

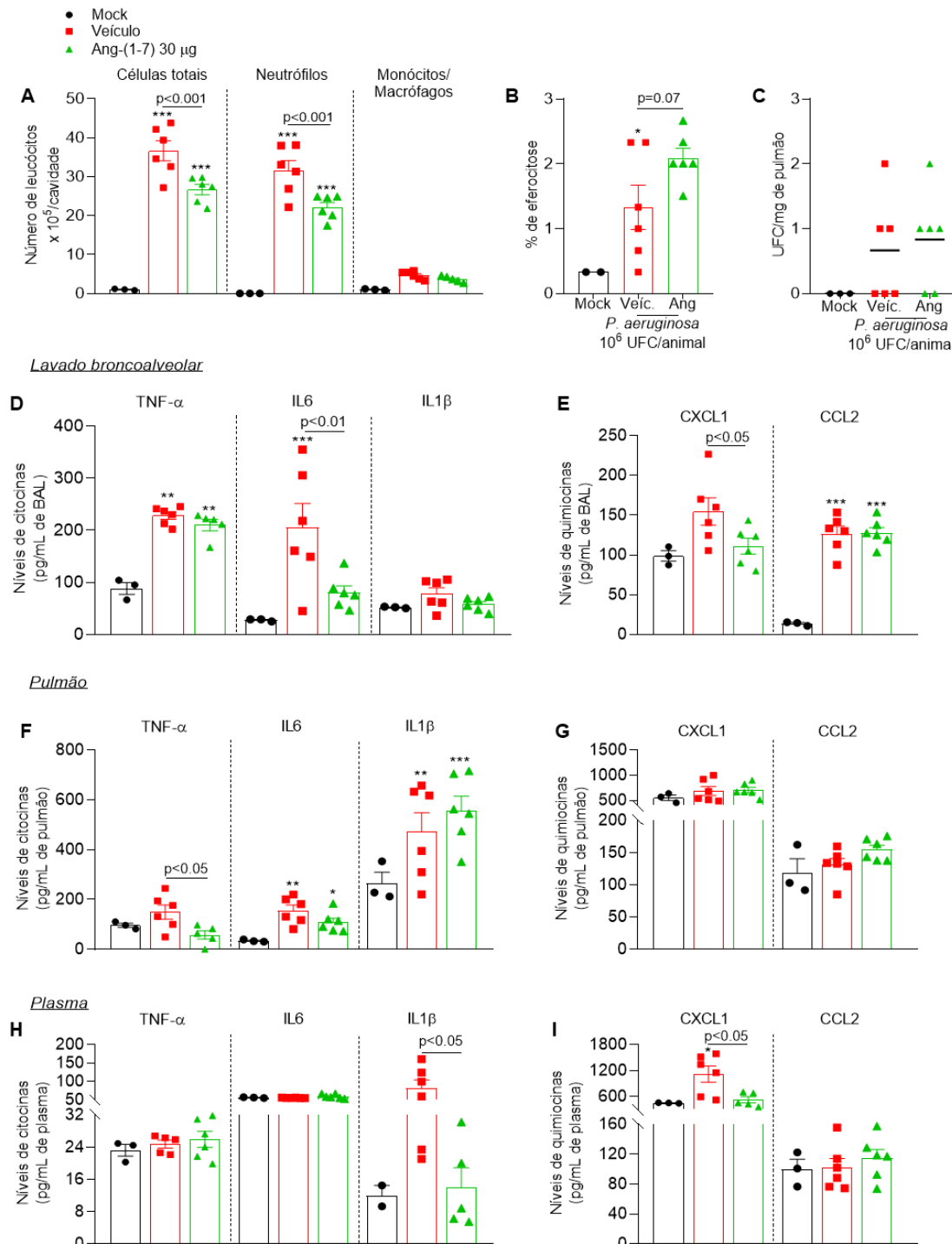


Figura 11: Efeito do tratamento com o peptídeo Ang-(1-7) sobre a inflamação pulmonar desencadeada pela infecção por *P. aeruginosa*. Camundongos C57/Bl6 WT foram infectados com *P. aeruginosa* por via intranasal (10^6 UFC/animal) e após 24h, tratados com Ang-(1-7), 30 µg por via intraperitoneal ($n = 3-6$ animais em cada grupo). Após 48h, o BAL foi coletado para contagem total e diferencial de células (A), contagem de eferocitose (B) e quantificação da carga bacteriana no pulmão (C). Os níveis de citocinas (TNF- α , IL6 and IL1 β) e quimiocinas (CXCL1 e CCL2) no BAL (D e E), nos pulmões (F e G) e no plasma (H e I) foram mensurados por ELISA. Resultados são expressos como média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0.001$ quando os animais são comparados ao grupo Mock. A diferença entre os grupos veículo e tratado, é indicada nos gráficos pelo valor de p.

5.2.5 O tratamento com Ang-(1-7) é capaz de atenuar o dano pulmonar causado pela infecção por *P. aeruginosa*

Tendo em vista que o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de reduzir o recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar, diminuindo a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, nosso próximo objetivo foi avaliar se o tratamento com o peptídeo seria capaz de minimizar o dano pulmonar causado pela infecção por *P. aeruginosa*. A análise histológica dos pulmões 48 horas após a infecção, mostrou que os animais do grupo veículo desenvolveram uma pneumonia grave, caracterizada por dano pulmonar acentuado e infiltrado marcante de células inflamatórias em bronquíolos e alvéolos (**Figura 12A**). Em concordância com nossos achados anteriores, os camundongos tratados com Ang-(1-7) apresentaram uma melhora em alguns parâmetros inflamatórios, com preservação da arquitetura pulmonar e redução do infiltrado leucocitário (**Figura 12A**). O score de dano pulmonar mostrou que, enquanto uma proporção maior de camundongos tratados com veículo apresentou pneumonia moderada a grave, todos os camundongos que foram tratados com Ang-(1-7) apresentaram sinais histológicos de pneumonia leve a moderada (**Figura 12B**). De forma complementar à redução da lesão pulmonar, os níveis de proteína total no lavado broncoalveolar, uma medida indireta de edema, também foram menores nos animais tratados com Ang-(1-7), em comparação com o grupo veículo (**Figura 11C**). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a regulação da inflamação pelo peptídeo reduziu a lesão pulmonar de modo geral.

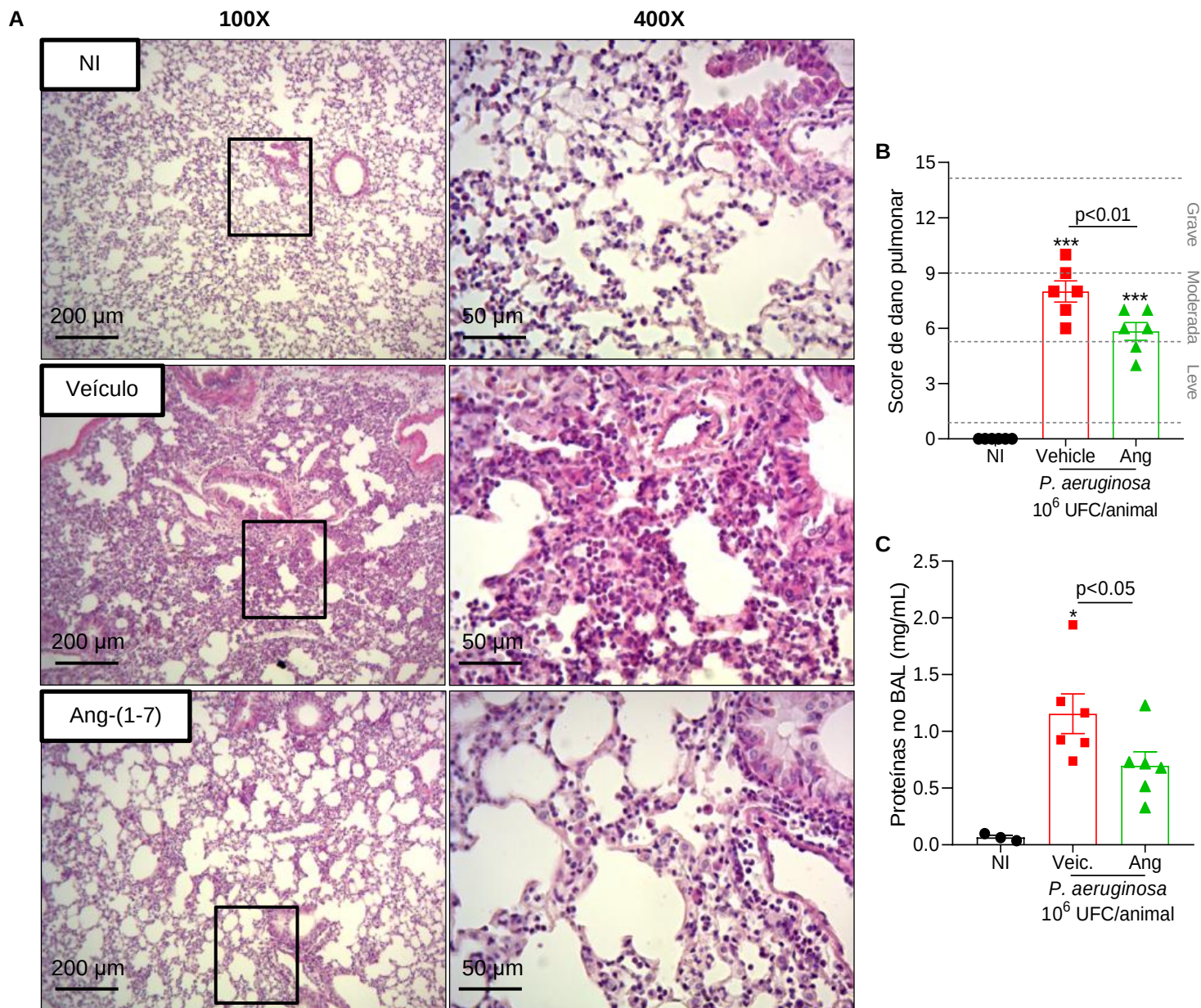


Figura 12: Efeito do tratamento com Ang-(1-7) no dano pulmonar causado pela infecção por *P. aeruginosa*. Camundongos C57/Bl 6 WT foram infectados com *P. aeruginosa* por via intranasal (10^6 UFC/animal) e após 48h, os pulmões foram coletados para análise histológica (n = 3-6 animais em cada grupo). Imagens representativas de pulmões corados por Hematoxilina e Eosina (H&E) são mostradas em (A). Escala = 200 μ m (ampliação menor) e 50 μ m (ampliação maior). Imagens da direita representam ampliações maiores (400X) das áreas selecionadas (caixas) nas imagens da esquerda (100X). O escore histopatológico avaliou inflamação das vias aéreas, vascular e parenquimatosa, infiltração neutrofílica e lesão epitelial (B). O nível de proteínas do BAL também foi avaliado (C). Resultados são expressos como média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0.001$ quando os animais são comparados ao grupo Mock. A diferença entre os grupos veículo e tratado, é indicada nos gráficos pelo valor de p.

5.2.6 O eixo *Ang*-(1-7)/*MasR* está envolvido com a fagocitose de *P. aeruginosa* por macrófagos

Tendo em vista os resultados anteriores, no modelo de peritonite, que mostram que o tratamento de macrófagos com o peptídeo *Ang*-(1-7) aumenta a fagocitose de *E. coli*, nosso próximo passo foi verificar se o mesmo acontece no contexto da infecção com *P. aeruginosa*. Para isso, 2×10^5 macrófagos alveolares (linhagem AMJ2.C11) foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com PMA a fim de se tornarem células aderentes. Após 12h, as células foram lavadas gentilmente com meio de cultura e foram então pré-tratadas por 1 hora com *Ang*-(1-7) (100 nM/poço). Podemos observar que o tratamento foi capaz de aumentar o número de bactérias internalizadas (**Figura 14A**) e a porcentagem de fagocitose (**Figura 14B**). Paralelamente, conduzimos o mesmo experimento, porém utilizando macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de animais WT e *MasR*^{-/-}. De encontro com nossos achados, macrófagos deficientes em *MasR* apresentaram menor capacidade fagocítica e portanto, menor percentual de fagocitose quando comparados às células WT (**Figuras 14C e D**).

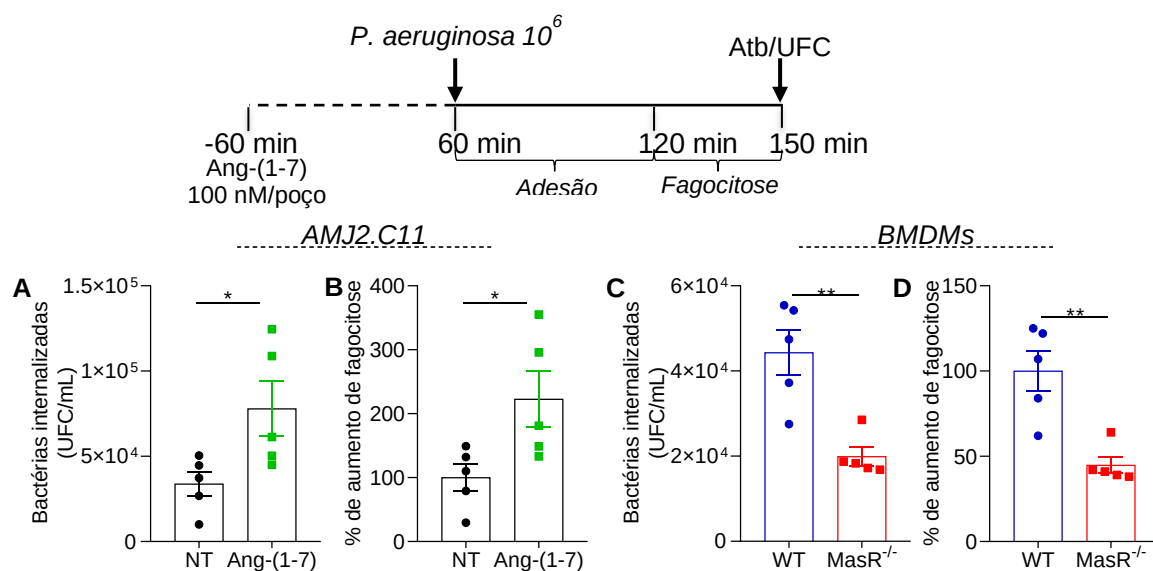


Figura 14: O eixo *Ang*-(1-7)/*MasR* está envolvido com a fagocitose de *P. aeruginosa* in vitro. A fagocitose de *P. aeruginosa* foi avaliada em macrófagos alveolares (linhagem AMJ2.C11) pré-tratados com *Ang*-(1-7), 100 nM, e em BMDMs de animais WT e *MasR*^{-/-}. Os resultados são expressos como UFC de bactérias internalizadas (A e C) ou % de fagocitose (B e D) (n=5). Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Foi utilizado teste t ao comparar dois grupos. *p<0.05, **p<0.01.

5.2.7 O tratamento com Ang-(1-7) protege parte dos camundongos da letalidade causada por *P. aeruginosa*

Considerando que o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de modular a inflamação, reduzir o *clearance* bacteriano e diminuir o dano pulmonar associado à infecção por *P. aeruginosa*, nosso próximo objetivo foi investigar se o tratamento poderia influenciar na sobrevivência do animal. Para isso, fizemos um experimento piloto utilizando camundongos Balb/c, que foram infectados por via intranasal com um inóculo mais alto (8×10^6 UFC) de *P. aeruginosa* e receberam Ang-(1-7) (100 µg em 200 µL) ou veículo (NaCl 0,9%, 200 µL) por via intraperitoneal 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a infecção e acompanhados por sete dias para avaliação de sobrevida e peso. Os animais tratados apenas com veículo, começaram a morrer mais precocemente (no segundo dia pós infecção), restando 50% dos animais ao final do experimento. O tratamento com Ang-(1-7) atrasou a letalidade em um dia e resultou na sobrevivência de 67% dos camundongos (**Figura 13A**). O gráfico da figura 13B mostra a intensa perda de peso causada pela infecção, sendo esta atenuada pelo tratamento com Ang-(1-7). Ressalta-se que este experimento ainda será repetido utilizando animais C57BL/6 e com maior N experimental.

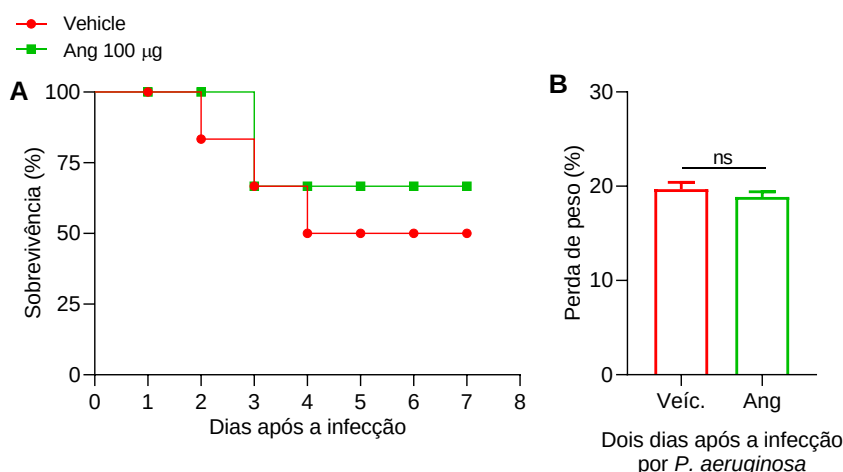


Figura 13: O tratamento com Ang-(1-7) protege parte dos camundongos da pneumonia causada por *P. aeruginosa*. Camundongos Balb/c foram infectados com *P. aeruginosa* por via intranasal (8×10^6 UFC/animal) e tratados com Ang-(1-7) (100 µg, i.p) ou veículo (salina 200 µL, i.p). Os grupos foram monitorados quanto a taxa de letalidade (A) e perda de peso (B). n = 6 animais por grupo. Resultados são expressos com média $\pm$ SEM. ns = sem diferença estatística.

6 DISCUSSÃO

As doenças infecciosas representam uma das principais causas de morte em todo o mundo. Um estudo recente demonstrou que as mortes associadas aos patógenos bacterianos representem 13,6% de todas as mortes globais e 56,2% de todas as mortes relacionadas à sepse em 2019 (Ikuta et al., 2022). Cinco dos principais patógenos – *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* – foram responsáveis por 54,9% das mortes entre as bactérias investigadas. Em 2019, mais de 6 milhões de mortes ocorreram como resultado de três síndromes infecciosas bacterianas, incluindo infecções respiratórias inferiores, da corrente sanguínea, infecções peritoneais e intra-abdominais (Ikuta et al., 2022).

Aliado a isso, o caráter inflamatório exacerbado envolvido nessas doenças contribui para lesão tecidual e resulta em uma série de desordens crônicas (Tavares et al. 2022). Por esse motivo, é necessário que a inflamação seja contrabalanceada por um programa resolutivo ativo e coordenado que se inicie brevemente após o início da resposta inflamatória, a fim de criar um ambiente favorável para a neutralização do potencial patógeno e retorno à homeostase tecidual (Nathan and Ding 2010; Tavares et al., 2022). A manutenção do agente indutor, a ativação excessiva e patológica de vias pró-inflamatórias ou mesmo uma falha nos mecanismos resolutivos podem resultar em uma resolução ineficiente ou inadequada da inflamação (Nathan and Ding, 2010).

Os mediadores pró-resolutivos endógenos orquestram a resolução, promovendo apoptose e eferocitose de granulócitos, reduzindo os níveis de mediadores pró-inflamatórios e induzindo o recrutamento não flogístico e a polarização de macrófagos para fenótipos regulatórios (El Kebir and Filep 2010). A compreensão dos mecanismos de ação desses mediadores auxilia no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças com caráter inflamatório (McArthur et al. 2015). Nos últimos anos, uma quantidade crescente de estudos tem demonstrado que o peptídeo Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] possui atividade pró-resolutiva. Nesse sentido, Ang-(1-7) mostrou ser benéfica

em vários modelos pré-clínicos de doença inflamatória, incluindo aqueles causados por infecções (Melo et al. 2020; Tsai et al. 2018; Soto et al., 2019).

Aqui, mostramos que a expressão do receptor Mas (MasR) é regulada positivamente durante a fase de resolução da inflamação. Primeiramente, macrófagos isolados em diferentes tempos após a indução de peritonite por *E. coli*, apresentaram maior expressão do receptor no tempo de resolução, ou seja, 48 horas após a infecção. Após caracterizarmos a cinética de expressão do receptor em modelo infeccioso, nosso próximo passo foi verificar a participação do mesmo na resolução da inflamação. Para isso, inibimos o receptor Mas, pelo uso do antagonista A779, no pico da peritonite. Tal inibição farmacológica impediu a resolução da inflamação, avaliada pela contagem do número de neutrófilos no tempo de 48 horas, sugerindo que o receptor participa de um programa endógeno de resolução da inflamação. De forma interessante, a dexametasona, um corticoide sintético amplamente utilizado e capaz de induzir mecanismos da resolução (McArthur et al. 2015; Vago et al. 2021), é capaz de aumentar a expressão de MasR (Ghadhanfar et al. 2017).

Uma vez demonstrado que a inibição farmacológica do receptor Mas impediu a resolução da inflamação no modelo de peritonite induzido por *E. coli*, nos perguntamos qual seria o impacto da deficiência genética do receptor neste mesmo modelo. Para isso, animais WT e Mas *knockout* (MasR^{-/-}) foram infectados intraperitonealmente com *E. coli* (10⁶ UFC/animal) e o recrutamento de leucócitos para a cavidade, avaliado em diferentes momentos pós infecção. Diferentemente dos resultados obtidos pela inibição farmacológica do receptor, com A779, camundongos MasR^{-/-} apresentaram número de neutrófilos semelhante ao de animais WT, no tempo de 48 horas. Por outro lado, o número de células mononucleares (monócitos/macrófagos) recrutadas para a cavidade peritoneal de animais MasR^{-/-}, nesse mesmo tempo, foi significativamente menor. Aliado a isso, os níveis de CCL2, principal quimiocina envolvida no recrutamento de células mononucleares, também foram bem menores na ausência do receptor. Pode-se supor que a ausência completa do receptor, antes e durante o modelo de peritonite, possa desencadear mecanismos compensatórios de resolução para a remoção dos neutrófilos, incluindo eferocitose por células residentes, como células epiteliais (Poon et al. 2014).

Além disso, o discreto aumento de macrófagos observado em animais MasR^{-/-}, 12 horas após o desafio com *E. coli*, pode ser suficiente para o *clearance* do número de neutrófilos observados nesse modelo de inflamação autorresolutivo.

Corroborando com nossos dados, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram no modelo autorresolutivo de pleurisia induzida por LPS, que camundongos *knockout* para GILZ, uma proteína pró-resolutiva induzida por glicocorticóides, foram capazes de resolver a inflamação neutrofílica gerada por esse modelo. Curiosamente, isso foi associado ao aumento da expressão da Anexina A1, outro potente mediador pró-resolutivo (Vago et al. 2012). De maneira semelhante, camundongos *knockout* para Anexina A1, também demonstraram resolver a peritonite autorresolutiva induzida por zimosan em taxas comparáveis a camundongos WT (Damazo et al. 2006). Portanto, nossa hipótese é que mecanismos compensatórios semelhantes podem estar envolvidos no *clearance* de neutrófilos nos animais MasR^{-/-}, mesmo em face de um menor número de macrófagos. Corroborando nossa hipótese, quando utilizamos um modelo infeccioso mais grave (pneumonia por *P. aeruginosa*) os animais MasR^{-/-} revelaram um fenótipo de inflamação mais exacerbada com maior infiltrado neutrofílico comparado aos animais WT.

Os macrófagos são leucócitos chave que promovem tanto o início quanto a resolução da inflamação (Shapouri-Moghaddam et al. 2018; Watanabe et al. 2019b). Essas células possuem uma plasticidade de respostas frente aos estímulos inflamatórios (Negreiros-Lima et al. 2020; Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Após a lesão tecidual, por exemplo, os macrófagos ativados produzem rapidamente quantidades significativas de citocinas, quimiocinas e outros mediadores que promovem a inflamação. Uma vez que o estímulo inflamatório é eliminado, ocorre uma mudança da produção de mediadores pró-inflamatórios para pró-resolutivos, desativando as vias de sinalização associadas à sobrevivência de leucócitos; apoptose de neutrófilos, seguida de sua eliminação por macrófagos, reprogramados para fenótipos pró-resolutivos (Alessandri et al., 2013).

Diante do importante papel dos macrófagos na resolução da inflamação, e levando-se em consideração nossos dados que demonstram que essas células estão reduzidas em animais MasR^{-/-} no modelo autorresolutivo de peritonite por *E. coli*, nosso próximo objetivo foi investigar se a fagocitose de bactérias estaria

comprometida nesses animais, após a infecção por *E. coli*. Aqui, demonstramos tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, que a fagocitose é significativamente menor na ausência do receptor Mas, o que pode estar contribuindo para a maior quantidade de bactérias no lavado peritoneal desses animais. De forma interessante, o tratamento de BMDMs *in vitro*, com o peptídeo Ang-(1-7), foi capaz de aumentar a fagocitose de bactérias, sem, no entanto, impactar na morte do microrganismo. De forma similar, Soto e colaboradores (2019), demonstraram que o tratamento com Ang-(1-7) e NorLeu [um análogo de Ang-(1-7)], foi capaz de aumentar a fagocitose de *Staphylococcus aureus*, em um modelo experimental de diabetes *mellitus* em camundongos.

Outro evento chave para a eficiência do processo de resolução é a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, denominada eferocitose (Sugimoto et al. 2016). Um defeito no *clearance* de células apoptóticas pode levar a necrose secundária dessas células, com liberação de conteúdo extracelular para o microambiente tecidual e posterior ativação de eventos inflamatórios prejudiciais ao tecido. Esse defeito está associado a muitas doenças inflamatórias autoimunes e crônicas (Nathan and Ding 2010; Poon et al. 2014). Além disso, ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstram que a eferocitose leva à reprogramação de macrófagos de um fenótipo pró-inflamatório para um fenótipo pró-resolutivo, o que modula a resposta inflamatória (Ariel and Serhan 2012).

Nossos resultados demonstram que o eixo Ang-(1-7)/MasR está envolvido na eferocitose de neutrófilos apoptóticos tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Aqui, quisemos avaliar não apenas o efeito do tratamento com Ang-(1-7), mas o envolvimento do receptor Mas nesse processo. De fato, células MasR^{-/-}, apresentaram menor capacidade eferocítica se comparadas as WT. Corroborando com nossos achados, Barroso e colaboradores (2018) demonstraram, em um modelo de artrite induzida por antígeno, que o tratamento com Ang-(1-7) no pico da inflamação foi capaz de promover resolução, efeito associado a apoptose de neutrófilos, seguida de eferocitose dessas células por macrófagos. É importante ressaltar que os efeitos pró-resolutivos de Ang-(1-7) foram inibidos pelo antagonista do receptor Mas, A779, o que evidencia, mais uma vez, que tais efeitos são dependentes do receptor. De modo similar, outro estudo demonstrou que o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de resolver a

inflamação eosinofílica envolvida na patogênese da asma, por induzir apoptose dessas células com consequente eferocitose (Magalhaes et al. 2018). Os mecanismos moleculares de sinalização induzidos por Ang-(1-7) via Mas que culminam com o aumento da eferocitose e fagocitose ainda precisam ser melhor estudados.

Em suma, no modelo de peritonite induzido por *E. coli* aqui estudado, demonstramos que na ausência do receptor Mas (demonstrado principalmente nos experimentos com inibição farmacológica), ocorre um atraso na resolução natural da inflamação, caracterizado pelo acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal. Além disso, os níveis de CCL2, o recrutamento monócitos/macrófagos para o peritônio, bem como a porcentagem de eferocitose, também é significativamente menor nos animais deficientes em MasR. Dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostram que 48 horas após a injeção de Ang-(1-7) na pleura de camundongos, ocorre um recrutamento significativo de monócitos/macrófagos para a cavidade, e que essas células abrigam ambos os receptores, MasR e CCR2, sugerindo que as 2 vias estão ativas na mesma célula (Zaidan et al. 2022). Numerosos relatos na literatura já demonstraram a cooperação entre os receptores, levando a quimiotaxia eficiente dos leucócitos. De fato, um receptor para um determinado mediador pode ser crítico para a quimiotaxia dos leucócitos em direção a um mediador diferente (que também se liga a outro receptor) (Vanbervliet et al. 2003; Gaudreault et al. 2005; Gouwy et al. 2011). Outro achado importante é o aumento do número de bactérias no lavado peritoneal dos animais MasR^{-/-}, evidenciando que, na ausência do receptor, ocorre uma possível falha nos mecanismos de fagocitose envolvidos no *clearance* de bactérias.

Após elucidarmos a participação do eixo Ang-(1-7)/MasR em um modelo auto resolutivo de peritonite induzido por *E. coli*, nosso próximo objetivo foi caracterizar melhor a participação desse eixo num modelo infeccioso mais grave e de importância clínica: o de pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa*. Além da pneumonia, a infecção por *P. aeruginosa* está envolvida em outras manifestações clínicas, como bacteremia e infecções do trato urinário, que acometem principalmente pacientes imunossuprimidos hospitalizados e que fizeram uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro (Gellatly and Hancock 2013). No ambiente hospitalar, estima-se que aproximadamente 60% dos

pacientes que dão entrada em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), desenvolvem uma doença infecciosa, das quais 11% estão relacionadas à infecção por *P. aeruginosa* (Choudhuri, Chakravarty, and Uppal 2017). Associado a isso, a porcentagem de pacientes internados em UTIs que fazem uso de antimicrobianos de amplo espectro, varia de 64% a 71%, o que se torna um fator de risco importante associado à infecção por essa bactéria. Devido a tais características epidemiológicas e ao perfil de resistência a múltiplas drogas, a descoberta de novas terapias antimicrobianas é de extrema importância no contexto de infecções causadas por *P. aeruginosa*.

Estudos demonstram que a resposta imune inata é essencial para o controle da infecção por *P. aeruginosa*, incluindo a produção de mediadores inflamatórios, recrutamento celular e depuração fagocítica por neutrófilos e macrófagos (Gonçalves-de-Albuquerque et al. 2016). A infecção pela bactéria resulta em um acúmulo maciço de neutrófilos em resposta à expressão prolongada e sustentada de mediadores inflamatórios pelo sistema imunológico do hospedeiro. De fato, aqui demonstramos que a infecção de camundongos por *P. aeruginosa* leva a um aumento do recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar, caracterizado principalmente por neutrófilos, sendo acompanhado da intensa produção e liberação de mediadores pró inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e CXCL-1 oito horas após a infecção. Nesse mesmo tempo, a carga bacteriana encontrada no lavado broncoalveolar e no pulmão dos animais infectados também atinge seu pico. Assim como no modelo de peritonite induzido por *E. coli* aqui estudado, podemos observar um aumento da expressão do receptor Mas nos tempos de 24 e 48 horas após a infecção. De forma interessante, esse aumento da expressão do receptor Mas, veio acompanhado de um aumento da expressão de Anexina A1, um mediador pró-resolutivo bem descrito e estudado pelo nosso grupo de pesquisa, capaz de induzir apoptose de neutrófilos, eferocitose, fagocitose de bactérias e respostas de reparo tecidual (Sugimoto et al. 2016). Nesse sentido, nossos dados demonstram que esse aumento da expressão de MasR e Anexina A1, vieram acompanhados de uma redução da carga bacteriana no lavado broncoalveolar e nos pulmões dos animais infectados com *P. aeruginosa*, além de um aumento na apoptose de neutrófilos, seguida de sua eferocitose. Ambos os achados são caracterizados como eventos chave para a resolução da inflamação. Corroborando com nossos

dados, Machado e colaboradores (2020) demonstraram que animais deficientes para Anexina A1 ou seu receptor FPR2, apresentaram exacerbação da inflamação pulmonar, caracterizada por aumento do recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar, além de maior carga bacteriana no BAL após infecção com *Streptococcus pneumoniae*.

Assim como no modelo de peritonite induzido por *E. coli* aqui estudado, nossos achados no modelo de pneumonia causada por *P. aeruginosa* demonstram que a deficiência do receptor Mas ($\text{MasR}^{-/-}$) leva a um maior recrutamento de leucócitos para a cavidade alveolar, sendo que a maioria dessas células são neutrófilos. Os neutrófilos são células efetoras essenciais para a eliminação dos patógenos invasores. No entanto, devido à grande quantidade de proteases e outras substâncias que produzem, a exacerbação da atividade dos neutrófilos pode ser deletéria para o tecido e contribuir para o desenvolvimento da doença, mesmo após a eliminação do microrganismo invasor. Dessa forma, uma característica histológica típica e essencial da resolução da inflamação é o *clearance* dos neutrófilos acumulados no sítio inflamatório, através da eferocitose (Greenlee-Wacker 2016; Robb et al. 2016; Sugimoto et al. 2016). De maneira interessante, a porcentagem de eferocitose em animais $\text{MasR}^{-/-}$, foi significativamente menor que em animais WT, sugerindo a maior permanência de neutrófilos no pulmão durante a infecção. Na deficiência de MasR, podemos observar uma maior produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias tanto no BAL quanto no pulmão. No entanto, as análises histopatológicas dos pulmões desses animais revelaram que o dano tecidual ocasionado pela infecção por *P. aeruginosa* foi semelhante ao encontrado nos animais WT, pelo menos no tempo analisado. De fato, *P. aeruginosa* pode induzir lesão pulmonar de várias maneiras. Uma das características da lesão pulmonar é o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, através do comprometimento de *tight junctions* (complexos de proteínas heteroméricas que formam a interface de vedação entre as células epiteliais adjacentes) o que leva a um maior extravasamento de proteínas para o espaço alveolar e consequentemente, edema (Rejman et al. 2007). De acordo, animais $\text{MasR}^{-/-}$, apresentam maiores quantidades de proteínas no lavado broncoalveolar se comparados aos animais WT.

Durante a fase resolutive da inflamação, predominam os macrófagos de perfil M2 e Mres (Schif-Zuck et al. 2011; Thieblemont et al. 2018). Os macrófagos M2 possuem alta capacidade eferocítica e secretam citocinas anti-inflamatórias durante a resolução (Nepal et al. 2019; Zhong et al. 2018). De forma interessante, os níveis de CCL2 e IL-10 foram menores no BAL desses animais, indicando uma falha no recrutamento e reprogramação de macrófagos para o local inflamado. Outro achado importante é a maior quantidade de bactérias no lavado bronco alveolar de animais MasR^{-/-}, o que pode estar envolvido com menor capacidade de fagocitose por células deficientes para o receptor Mas. Corroborando com nossos achados, Melo e colaboradores (2021) demonstraram que em animais MasR^{-/-}, a pneumonia causada pelo vírus Influenza A foi mais grave. Foi observado um maior recrutamento de neutrófilos para o pulmão acompanhado de maiores títulos virais no tecido nos animais MasR^{-/-} quando comparados aos WT (Melo et al., 2021). De forma interessante, os níveis de Anexina A1 intacta, que possui a propriedade pró-resolutiva dessa proteína, são menores nesses animais, o que corrobora com nossa hipótese de que na ausência de MasR há um comprometimento da resolução da inflamação, o que leva a permanência de neutrófilos no sítio inflamado com consequente liberação de proteases e clivagem de AnxA1 (Tavares et al, 2014; Vago et al, 2016) e manutenção da carga bacteriana.

Tendo em vista que a deficiência do receptor Mas leva a uma exacerbação da resposta inflamatória causada pela infecção por *P. aeruginosa*, nosso próximo objetivo foi investigar se o tratamento com Ang-(1-7) seria capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios aqui observados: o recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar, a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios e a carga bacteriana no BAL e no pulmão dos animais infectados. Diferente da estratégia adotada nos experimentos com animais MasR^{-/-}, a avaliação dos parâmetros inflamatórios citados anteriormente foi feita 48 horas após a infecção, uma vez que o tratamento com o peptídeo foi realizado no tempo de 24 horas, onde observamos aumento da expressão do receptor Mas, através do qual Ang-(1-7) se liga e desencadeia seus efeitos. O tratamento dos animais com Ang-(1-7) 24 horas após a infecção com *P. aeruginosa*, levou a uma diminuição no recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar, principalmente

de neutrófilos. Sabemos que a produção de Ang-(1-7) ocorre principalmente pela ação da Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA II) sobre a Angiotensina II (Ang II). Nesse sentido, Sodhi e colaboradores (2019) mostraram que a inibição de ECA2 no modelo de infecção pulmonar por *P. aeruginosa* leva a um atraso no processo de resolução da inflamação neutrofílica. Além disso, o uso da enzima recombinante foi benéfico no contexto estudado, reduzindo a infiltração de neutrófilos e a inflamação pulmonar. Assim como no protocolo adotado em nosso estudo, ambas as intervenções farmacológicas foram feitas no tempo de 24 horas após a infecção. Nossa hipótese é que Ang-(1-7) estaria agindo diretamente sobre os neutrófilos, diminuindo de maneira geral, a ativação dessas células, o que contribui em parte, para o menor dano pulmonar observado nos animais após a infecção com *P. aeruginosa*.

O tratamento com Ang-(1-7) também foi capaz de diminuir os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias no BAL, no pulmão e no plasma de animais infectados, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Corroborando com nosso achado que o uso do peptídeo diminuiu o recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar, observamos menores níveis da quimiocinas CXCL-1 tanto no BAL, quanto no plasma nos animais tratados com Ang-(1-7), se comparados aos do grupo veículo. Uma ativação efetiva da resposta imune frente à bactérias ou seus componentes é essencial para a manutenção da função pulmonar e da homeostase. De fato, a infecção por *P. aeruginosa* conduz a ativação de vias de sinalização intracelulares, levando à produção de mediadores inflamatórios e morte celular, o que acaba induzindo dano pulmonar (Gonçalves-de-Albuquerque et al. 2016). As análises histopatológicas mostram intenso infiltrado leucocitário nos pulmões de animais do grupo veículo, compatível com desenvolvimento de pneumonia moderada a grave. O tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de reduzir o dano pulmonar causado pela infecção, além de diminuir a quantidade de proteínas no BAL dos animais infectados. Acreditamos que não foi possível observar redução da carga bacteriana no BAL e no pulmão, após o tratamento com Ang-(1-7), devido ao tempo analisado. Como demonstrado no experimento de padronização, no tempo de 48 horas, a carga bacteriana em ambos os sítios já é mínima. Nesse sentido, um experimento realizado administrando o peptídeo no tempo de 12h e retirando-se o BAL com 24 mostrou

maior redução da carga bacteriana, sugerindo que seu uso poderia ser complementar a antibioticoterapia, modulando a resposta inflamatória e minimizando o dano pulmonar e ainda ajudando o antibiótico a atuar no controle bacteriano.

Corroborando com o papel essencial do receptor Mas no controle bacteriano nos pulmões, nossos ensaios de fagocitose *in vitro* demonstram que macrófagos derivados de medula óssea de animais MasR^{-/-} apresentaram menor capacidade fagocítica quando comparadas as células oriundas de animais WT. De forma interessante, o tratamento de macrófagos alveolares, *in vitro*, com Ang-(1-7) foi capaz de aumentar a fagocitose de bactérias, quando comparado ao grupo não tratado. Vários estudos demonstram que a fagocitose é essencial para a eliminação rápida de muitos patógenos pulmonares, incluindo *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, portanto, uma deficiência na fagocitose geralmente resulta em agravamento das infecções causadas por esses agentes etiológicos, como no caso da pneumonia, que causa elevados índices de morbidade e mortalidade (Broug-Holub, et al. 1997, Knapp et al. 2003).

Sabendo que o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de reduzir a inflamação pulmonar decorrente da infecção por *P. aeruginosa*, diminuindo a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o recrutamento de neutrófilos para o espaço broncoalveolar e o dano histopatológico, nosso próximo objetivo foi investigar se o uso do peptídeo protegeria os animais da pneumonia letal causada pela bactéria. Embora nossos dados não demonstrem redução significativa da taxa de letalidade dos animais tratados com Ang-(1-7), observamos uma proteção de aproximadamente 20% em relação ao grupo veículo. Considerando os altos índices de morte associados a infecção por *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar, a proteção conferida pelo uso de Ang-(1-7) pode ser vista como algo relevante epidemiologicamente, principalmente se associado ao uso de antimicrobianos. Mais estudos com um maior N experimental e utilizando animais C57BL/6 são necessários para esclarecer melhor o esquema terapêutico e via de administração a serem adotados para melhor eficácia do tratamento com o peptídeo.

7 CONCLUSÃO

Uma quantidade crescente de evidências na literatura apoia o papel protetor do eixo contrarregulatório do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, do qual a Ang-(1-7) e seu receptor Mas participam, no contexto de doenças infecciosas, incluindo pneumonias bacteriana e viral, e sepse. No contexto de peritonite induzida por *E. coli*, nossos dados demonstram que a ausência do receptor Mas, leva a um atraso na resolução da inflamação, por comprometer o recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal, reduzir a eferocitose de neutrófilos apoptóticos e o *clearance* bacteriano. De modo similar, no modelo de pneumonia induzida por *P. aeruginosa*, animais deficientes para o receptor Mas demonstraram ser mais susceptíveis à infecção pulmonar, apresentando maior número de neutrófilos no lavado bronco alveolar, maior carga bacteriana, além de níveis aumentados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

De forma complementar, o tratamento com Ang-(1-7) foi capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar, diminuindo a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios e o dano pulmonar ocasionado pela infecção por *P. aeruginosa*. *In vitro*, nossos dados demonstram que o uso do peptídeo foi capaz de aumentar a fagocitose da bactéria por macrófagos alveolares, o que é fundamental para o controle da disseminação bacteriana no contexto de pneumonia. A identificação de mecanismos e ações pró-resolutivas da Ang-(1-7) abrirá caminho para o desenvolvimento de terapias direcionadas para diferentes doenças infecciosas e inflamatórias.

8. RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E DE OUTRAS ATIVIDADES NO PERÍODO

8.1 Artigos completos publicados em periódicos

1. **Zaidan, I.**, Tavares, L. P., Sugimoto, M. A., Lima, K. M., Negreiros-Lima, G. L., Teixeira, L. C., Miranda, T. C., Valiate, B. V., Cramer, A., Vago, J. P., Campolina-Silva, G. H., Souza, J. A., Grossi, L. C., Pinho, V., Campagnole-Santos, M. J., Santos, R. A., Teixeira, M. M., Galvão, I., & Sousa, L. P. (2022). Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis. *JCI insight*, 7(1), e147819. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147819>
2. Souza, J.A.M.; Carvalho, A.F.S.; Grossi, L.C.; **Zaidan, I.**; de Oliveira, L.C.; Vago, J.P.; Cardoso, C.; Machado, M.G.; Souza, G.V.S.; Queiroz-Junior, C.M.; Morand, E.F.; Bruscoli, S.; Riccardi, C.; Teixeira, M.M.; Tavares, L.P.; Sousa, L.P. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Alleviates Lung Inflammation and Enhances Bacterial Clearance during Pneumococcal Pneumonia. *Cells* 2022, 11, 532. <https://doi.org/10.3390/cells11030532>
3. Negreiros-Lima, G. L., Lima, K. M., **Moreira, I. Z.**, Jardim, B., Vago, J. P., Galvão, I., Teixeira, L., Pinho, V., Teixeira, M. M., Sugimoto, M. A., & Sousa, L. P. (2020). Cyclic AMP Regulates Key Features of Macrophages via PKA: Recruitment, Reprogramming and Efferocytosis. *Cells*, 9(1), 128. <https://doi.org/10.3390/cells9010128>
4. Vago, J. P., Galvão, I., Negreiros-Lima, G. L., Teixeira, L., Lima, K. M., Sugimoto, M. A., **Moreira, I. Z.**, Jones, S. A., Lang, T., Riccardi, C., Teixeira, M. M., Harris, J., Morand, E. F., & Sousa, L. P. (2020). Glucocorticoid-induced leucine zipper modulates macrophage polarization and apoptotic cell clearance. *Pharmacological research*, 158, 104842. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104842>
5. Felix, F. B., Vago, J. P., Fernandes, D. O., Martins, D. G., **Moreira, I. Z.**, Gonçalves, W. A., Costa, W. C., Araújo, J., Queiroz-Junior, C. M., Campolina-Silva, G. H., Soriani, F. M., Sousa, L. P., Grespan, R., Teixeira, M. M., & Pinho, V. (2021). Biochanin A Regulates Key Steps of Inflammation Resolution in a Model of Antigen-Induced Arthritis via GPR30/PKA-Dependent Mechanism. *Frontiers in pharmacology*, 12, 662308. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.662308>
6. Manuscrito submetido no JCI Insight: “Plasmin and plasminogen prevent sepsis severity by reducing neutrophil extracellular traps and systemic inflammation”. 2022.

8.2 Capítulo de livro

1. Izabela Galvão, Flávia Rago, **Isabella Zaidan Moreira**, Mauro Martins Teixeira. 2019. "Angiotensin 1-7 and Inflammation". In: Santos R. (eds) Angiotensin-(1-7). Springer, Cham.

8.3 Participação em eventos

1. Sexto Simpósio Internacional de Doenças Inflamatórias 2021 – INFLAMMA VI. Apresentação do trabalho: "Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of regulatory monocyte/macrophage to perform phagocytosis and efferocytosis". Junho/2021.
2. Segundo SLIM 2022 – Simpósio do Laboratório de Imunofarmacologia. Apresentação do trabalho: "Relevance of Angiotensin-(1-7)/MasR axis in pneumonia induced by Pseudomonas aeruginosa". Agosto/2022.
3. 54º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – SBFTE. Menção honrosa pela apresentação do trabalho: "Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis". Outubro/2022.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackermann, Maximilian et al. 2020. "Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19." *New England Journal of Medicine*.
- Alessandri, Ana L. et al. 2013. "Resolution of Inflammation: Mechanisms and Opportunity for Drug Development." *Pharmacology and Therapeutics* 139(2): 189–212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.006>.
- Anderl, Jeff N., Michael J. Franklin, and Philip S. Stewart. 2000. "Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella Pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(7): 1818–24.
- Ariel, Amiram, and Charles N. Serhan. 2012. "New Lives given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation." *Frontiers in Immunology*.
- Bader, M., N. Alenina, M. A. Andrade-Navarro, and R. A. Santos. 2014. "Mas and Its Related G Protein-Coupled Receptors, Mrgprs." *Pharmacological Reviews*.
- Bader, Michael, and Detlev Ganten. 2008. "Update on Tissue Renin-Angiotensin Systems." *Journal of Molecular Medicine*.
- Barroso, Livia C. et al. 2017. "Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Neutrophilic Inflammation in a Model of Antigen-Induced Arthritis in Mice." *Frontiers in Immunology*.
- Barroso, Livia Corrêa et al. 2012. "Renoprotective Effects of AVE0991, a Nonpeptide Mas Receptor Agonist, in Experimental Acute Renal Injury." *International Journal of Hypertension*.
- Benigni, Ariela, Paola Cassis, and Giuseppe Remuzzi. 2010. "Angiotensin II Revisited: New Roles in Inflammation, Immunology and Aging." *EMBO Molecular Medicine*.
- Broug-Holub, E., Toews, G. B., van Iwaarden, J. F., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Paine, R., 3rd, & Standiford, T. J. (1997). Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infection and immunity*, 65(4), 1139–1146.
- Cao, Duo Yao et al. 2021. "An ACE Inhibitor Reduces Bactericidal Activity of Human Neutrophils in Vitro and Impairs Mouse Neutrophil Activity in Vivo." *Science Translational Medicine*.
- Carey, Robert M. 2005. "Cardiovascular and Renal Regulation by the Angiotensin Type 2 Receptor: The AT2receptor Comes of Age." *Hypertension*.
- Carey, Robert M., and Helmy M. Siragy. 2003. "Newly Recognized Components

- of the Renin-Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation.” *Endocrine Reviews*.
- De Carvalho Santuchi, Melissa et al. 2019. “Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-Inflammatory Response in Macrophages in Vitro and in Vivo.” *Mediators of Inflammation*.
- De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., & Hogg, N. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, 121(24), 4930–4937. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-486217>
- Chen, Jin Liang et al. 2017. “Angiotensin-(1–7) Administration Attenuates Alzheimer’s Disease-like Neuropathology in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes via Mas Receptor Activation.” *Neuroscience*.
- Chiang, Nan et al. 2012. “Infection Regulates Pro-Resolving Mediators That Lower Antibiotic Requirements.” *Nature*.
- Choudhuri, Anirban Hom, Mitali Chakravarty, and Rajeev Uppal. 2017. “Influence of Admission Source on the Outcome of Patients in an Intensive Care Unit.” *Indian Journal of Critical Care Medicine* 21(4): 213–17.
- Collins, Katie L. et al. 2021. “Angiotensin-(1–7) Peptide Hormone Reduces Inflammation and Pathogen Burden during Mycoplasma Pneumoniae Infection in Mice.” *Pharmaceutics*.
- Costa, Vivian Vasconcelos, Caio Tavares Fagundes, Danielle G. Souza, and Mauro Martins Teixeira. 2013. “Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection: Protection versus Disease Induction.” *American Journal of Pathology* 182(6): 1950–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.027>.
- Dalli, J., & Serhan, C. N. (2017). Pro-Resolving Mediators in Regulating and Conferring Macrophage Function. *Frontiers in immunology*, 8, 1400. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01400>
- Damazo, Amilcar S et al. 2006. “Spatial and Temporal Profiles for Anti-Inflammatory Gene Expression in Leukocytes during a Resolving Model of Peritonitis.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176(7): 4410–18.
- Das, Theerthankar et al. 2010. “Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation.” *Applied and Environmental Microbiology* 76(10): 3405–8.
- Delibegovic S. (2007). Pathophysiological changes in peritonitis. *Medicinski arhiv*, 61(2), 109–113.
- Fagundes, Caio T. et al. 2012. “Adapting to Environmental Stresses: The Role of the Microbiota in Controlling Innate Immunity and Behavioral Responses.” *Immunological Reviews* 245(1): 250–64.
- Ferrario, Carlos M. et al. 1997. “Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7).”

Hypertension.

- Ferrario, Carlos M. et al.. 2006. "Role of Angiotensin II in Cardiovascular Disease - Therapeutic Implications of More than a Century of Research." *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*.
- Fujitani, S., Sun, H. Y., Yu, V. L., & Weingarten, J. A. (2011). Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*, 139(4), 909–919. <https://doi.org/10.1378/chest.10-0166>.
- Fullerton, James N., and Derek W. Gilroy. 2016. "Resolution of Inflammation: A New Therapeutic Frontier." *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Gaudreault E, et al. (2005) Involvement of leukotriene B4 receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 75(1–4):25–34.
- Galvão, Izabela et al. 2018. "Mediators of Inflammation." *Immunopharmacology and Inflammation*: 3–32.
- Gellatly, Shaan L., and Robert E.W. Hancock. 2013. "Pseudomonas Aeruginosa: New Insights into Pathogenesis and Host Defenses." *Pathogens and Disease* 67(3): 159–73.
- Gonçalves-de-Albuquerque, Cassiano Felipe et al. 2016. "Possible Mechanisms of Pseudomonas Aeruginosa-Associated Lung Disease." *International Journal of Medical Microbiology* 306(1): 20–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.001>.
- Gouwy M, et al. (2011) CXCR4 and CCR5 ligands cooperate in monocyte and lymphocyte migration and in inhibition of dual-tropic (R5/X4) HIV-1 infection. *Eur J Immunol*. 41(4):963–973.
- Ghadhanfar E, Alsalem A, Al-Kandari S, Naser J, Babiker F, and Al-Bader M. The role of ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas1 receptor axis in glucocorticoid-induced intrauterine growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):97.
- Greenlee-Wacker, Mallary C. 2016. "Clearance of Apoptotic Neutrophils and Resolution of Inflammation." *Immunological Reviews*.
- Griendling, K. K., T. J. Murphy, and R. W. Alexander. 1993. "Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System." *Circulation*.
- Hammer, Anna et al. 2016. "Role of the Receptor Mas in Macrophage-Mediated Inflammation in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(49): 14109–14. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1612668113>.
- Henry, Brandon M. et al. 2021. "Coronavirus Disease 2019 Is Associated with Low Circulating Plasma Levels of Angiotensin 1 and Angiotensin 1,7." *Journal of Medical Virology*.

- Hickey, Michael J., and Paul Kubes. 2009. "Intravascular Immunity: The Host-Pathogen Encounter in Blood Vessels." *Nature Reviews Immunology*.
- Huang, Fengming et al. 2014. "Angiotensin II Plasma Levels Are Linked to Disease Severity and Predict Fatal Outcomes in H7N9-Infected Patients." *Nature Communications*.
- Imai, Yumiko et al. 2005. "Angiotensin-Converting Enzyme 2 Protects from Severe Acute Lung Failure." *Nature*.
- Ikuta, Kevin S. et al. 2022. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*.
- El Kebir, Driss, and János G. Filep. 2010. "Role of Neutrophil Apoptosis in the Resolution of Inflammation." *TheScientificWorldJournal* 10: 1731–48.
- Knapp, S., Leemans, J. C., Florquin, S., Branger, J., Maris, N. A., Pater, J., van Rooijen, N., & van der Poll, T. (2003). Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167(2), 171–179.
- Kosilova, O. Y., Vovk, O. O., Katelevska, N. M., Osolodchenko, T. P., Ponomarenko, S. V., & Vdovichenko, V. Y. (2020). Study of pathogenic factors of e.coli isolated from patients with peritonitis. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*, 73(1), 78–82.
- Kratofil, Rachel M., Paul Kubes, and Justin F. Deniset. 2017. "Monocyte Conversion during Inflammation and Injury." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.
- Laroche, M., & Harding, G. (1998). Primary and secondary peritonitis: an update. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 17(8), 542–550. <https://doi.org/10.1007/BF01708616>.
- Lautner, Roberto Queiroga et al. 2013. "Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin-Angiotensin System." *Circulation Research*.
- Letko, Michael, Andrea Marzi, and Vincent Munster. 2020. "Functional Assessment of Cell Entry and Receptor Usage for SARS-CoV-2 and Other Lineage B Betacoronaviruses." *Nature Microbiology*.
- Lovren, Fina et al. 2008. "Angiotensin Converting Enzyme-2 Confers Endothelial Protection and Attenuates Atherosclerosis." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
- Magalhaes, Giselle S. et al. 2018. "Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma." *Frontiers in Immunology*.
- Matthew Spite, Lucy V. Norling, Lisa Summers, Rong Yang, Dianne Cooper,

- Nicos A. Petasis, Roderick J. Flower, Mauro Perretti, and Charles N. Serhan. 2017. "Resolvin D2 Is a Potent Regulator of Leukocytes and Controls Microbial Sepsis." *Physiology & behavior* 176(10): 139–48.
- McArthur, Simon et al. 2015. "Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation." *The Journal of Immunology* 195(3): 1139–51. <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1500733>.
- Medzhitov, Ruslan. 2008. "Origin and Physiological Roles of Inflammation." *Nature*.
- Medzhitov, Ruslan. 2010. "Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame." *Cell*.
- Melo, Eliza M. et al. 2020. "Relevance of Angiotensin-(1-7) and Its Receptor Mas in Pneumonia Caused by Influenza Virus and Post-Influenza Pneumococcal Infection." *Pharmacological Research*: 105292.
- Mosser, David M., and Justin P. Edwards. 2008. "Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation." *Nature Reviews Immunology*.
- Naruse, K. et al. 1982. "Immunohistochemical Evidence That Angiotensins I and II Are Formed by Intracellular Mechanism in Juxtaglomerular Cells." *Hypertension*.
- Nathan, Carl. 2008. "Metchnikoff's Legacy in 2008." In *Nature Immunology*,.
- Nathan, Carl, and Aihao Ding. 2010. "Nonresolving Inflammation." *Cell*.
- Negreiros-Lima, Grazielle L. et al. 2020. "Cyclic AMP Regulates Key Features of Macrophages via PKA: Recruitment, Reprogramming and Efferocytosis." *Cells* 9(1): 128.
- Nepal, Saroj et al. 2019. "STAT6 Induces Expression of Gas6 in Macrophages to Clear Apoptotic Neutrophils and Resolve Inflammation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(33): 16513–18.
- Neth, O. W., M. Bajaj-Elliott, M. W. Turner, and Nigel J. Klein. 2005. "Susceptibility to Infection in Patients with Neutropenia: The Role of the Innate Immune System." *British Journal of Haematology* 129(6): 713–22.
- Ng, Hang Pong, Scott Jennings, Steve Nelson, and Guoshun Wang. 2020. "Short-Chain Alcohols Upregulate GILZ Gene Expression and Attenuate LPS-Induced Septic Immune Response." *Frontiers in Immunology*.
- Nguyen Dinh Cat, Aurelie, and Rhian M. Touyz. 2011. "A New Look at the Renin-Angiotensin System - Focusing on the Vascular System." *Peptides*.
- Palomino, Diana Carolina Torres, and Luciana Cavalleiro Marti. 2015. "Chemokines and Immunity." *Einstein (São Paulo)*.
- Pang, Zheng et al. 2019. "Antibiotic Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*:

- Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies.” *Biotechnology Advances* 37(1): 177–92. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.
- Perretti, Mauro, Xavier Leroy, Elliot J. Bland, and Trinidad Montero-Melendez. 2015. “Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation.” *Trends in Pharmacological Sciences*.
- Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes. 2008. “The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective.” *The Journal of Immunology*.
- Piaton, E., Fabre, M., Goubin-Versini, I., Bretz-Grenier, M. F., Courtade-Saïdi, M., Vincent, S., Belleannée, G., Thivolet, F., Boutonnat, J., Debaque, H., Fleury-Feith, J., Vielh, P., Cochand-Priollet, B., pour la Société française de cytologie clinique (SFCC), Egelé, C., Bellocq, J. P., Michiels, J. F., & pour l'Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques (AFAQAP) (2015). Technical recommendations and best practice guidelines for May-Grünwald-Giemsa staining: literature review and insights from the quality assurance. *Annales de pathologie*, 35(4), 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2015.05.019>
- Poon, Ivan K.H., Christopher D. Lucas, Adriano G. Rossi, and Kodi S. Ravichandran. 2014. “Apoptotic Cell Clearance: Basic Biology and Therapeutic Potential.” *Nature Reviews Immunology*.
- Pörner, D., Von Vietinghoff, S., Nattermann, J., Strassburg, C. P., & Lutz, P. (2021). Advances in the pharmacological management of bacterial peritonitis. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 22(12), 1567–1578. <https://doi.org/10.1080/14656566.2021.1915288>.
- Prince, Lynne R., Moira K. Whyte, Ian Sabroe, and Lisa C. Parker. 2011. “The Role of TLRs in Neutrophil Activation.” *Current Opinion in Pharmacology*.
- Reindl-Schwaighofer, Roman et al. 2021. “ACE2 Elevation in Severe COVID-19.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.
- Rejman, J., Di Gioia, S., Bragonzi, A., & Conese, M. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* infection destroys the barrier function of lung epithelium and enhances polyplex-mediated transfection. *Human gene therapy*, 18(7), 642–652. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.192>
- Robb, C. T., K. H. Regan, D. A. Dorward, and A. G. Rossi. 2016. “Key Mechanisms Governing Resolution of Lung Inflammation.” *Seminars in Immunopathology*.
- Sampaio, Walkyria O. et al. 2007. “Angiotensin-(1-7) Counterregulates Angiotensin II Signaling in Human Endothelial Cells.” *Hypertension*.
- Sampaio, Walkyria Oliveira et al. 2007. “Angiotensin-(1-7) through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways.” *Hypertension*.
- Sainz-Mejías, M., Jurado-Martín, I., & McClean, S. (2020). Understanding *Pseudomonas aeruginosa*-Host Interactions: The Ongoing Quest for an Efficacious Vaccine. *Cells*, 9(12), 2617.

<https://doi.org/10.3390/cells9122617>.

- Santos, R. A. S. et al. 2003. "Angiotensin-(1-7) Is an Endogenous Ligand for the G Protein-Coupled Receptor Mas." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Santos, Robson A.S., Maria J. Campagnole-Santos, and Sílvia P. Andrade. 2000. "Angiotensin-(1-7): An Update." *Regulatory Peptides*.
- Schif-Zuck, Sagie et al. 2011. "Saturated-Efferocytosis Generates pro-Resolving CD11b^{low} Macrophages: Modulation by Resolvins and Glucocorticoids." *European Journal of Immunology* 41(2): 366–79.
- Serbina, Natalya V., and Eric G. Pamer. 2006. "Monocyte Emigration from Bone Marrow during Bacterial Infection Requires Signals Mediated by Chemokine Receptor CCR2." *Nature Immunology*.
- Serhan, Charles N et al. 2011. "Manuscript Resolution of Inflammation : State of the Art , Definitions and Terms." 21(2): 325–32.
- Shapouri-Moghaddam, Abbas et al. 2018. "Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease." *Journal of Cellular Physiology* 233(9): 6425–40.
- da Silveira, Kátia Daniela et al. 2010. "Anti-Inflammatory Effects of the Activation of the Angiotensin-(1–7) Receptor, Mas, in Experimental Models of Arthritis." *The Journal of Immunology* 185(9): 5569–76.
- Da Silveira, Kátianiela et al. 2013. "Beneficial Effects of the Activation of the Angiotensin-(1-7) Mas Receptor in a Murine Model of Adriamycin-Induced Nephropathy." *PLoS ONE* 8(6).
- Simon, Scott I., and Chad E. Green. 2005. "Molecular Mechanics and Dynamics of Leukocyte Recruitment During Inflammation." *Annual Review of Biomedical Engineering*.
- Sodhi, Chhinder P. et al. 2019. " A Dynamic Variation of Pulmonary ACE2 Is Required to Modulate Neutrophilic Inflammation in Response to Pseudomonas Aeruginosa Lung Infection in Mice ." *The Journal of Immunology*.
- Soto, Maira, Kevin J. Gaffney, and Kathleen E. Rodgers. 2019. "Improving the Innate Immune Response in Diabetes by Modifying the Renin Angiotensin System." *Frontiers in Immunology*.
- Sousa, Lirlândia Pires, Ana Leticia Alessandri, Vanessa Pinho, and Mauro Martins Teixeira. 2013. "Pharmacological Strategies to Resolve Acute Inflammation." *Current Opinion in Pharmacology*.
- Souza, Laura L., and Claudio M. Costa-Neto. 2012. "Angiotensin-(1-7) Decreases LPS-Induced Inflammatory Response in Macrophages." *Journal of Cellular Physiology*.
- Stewart, Philip S. 2002. "Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacterial

- Biofilms." *International Journal of Medical Microbiology* 292(2): 107–13.
- Stewart, Philip S., and J. William Costerton. 2001. "Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms." *Lancet* 358(9276): 135–38.
- Sugimoto, Michelle A. et al. 2016. "Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?" *Frontiers in Immunology* 7(APR).
- Sugimoto, Michelle A., Juliana P. Vago, Mauro Perretti, and Mauro M. Teixeira. 2019. "Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response." *Trends in Immunology*.
- Summers, Charlotte et al. 2010. "Neutrophil Kinetics in Health and Disease." *Trends in Immunology*.
- Szeto, C. C., Chow, V. C., Chow, K. M., Lai, R. W., Chung, K. Y., Leung, C. B., Kwan, B. C., & Li, P. K. (2006). Enterobacteriaceae peritonitis complicating peritoneal dialysis: a review of 210 consecutive cases. *Kidney international*, 69(7), 1245–1252. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000037>.
- Tak, T. et al. 2013. "What's Your Age Again? Determination of Human Neutrophil Half-Lives Revisited." *Journal of Leukocyte Biology*.
- Tavares, Luciana Pádua, Eliza Mathias Melo, Lirlândia Pires Sousa, and Mauro Martins Teixeira. 2022. "Pro-Resolving Therapies as Potential Adjunct Treatment for Infectious Diseases: Evidence from Studies with Annexin A1 and Angiotensin-(1-7)." *Seminars in Immunology* (November 2021).
- Thieblemont, Nathalie, Véronique Witko-Sarsat, and Amiram Ariel. 2018. "Regulation of Macrophage Activation by Proteins Expressed on Apoptotic Neutrophils: Subversion towards Autoimmunity by Proteinase 3." *European Journal of Clinical Investigation* 48(February): 1–10.
- Tsai, Hsin Jung et al. 2018. "Angiotensin-(1-7) Attenuates Organ Injury and Mortality in Rats with Polymicrobial Sepsis." *Critical Care*.
- Vago, J. P. et al. 2012. "Annexin A1 Modulates Natural and Glucocorticoid-Induced Resolution of Inflammation by Enhancing Neutrophil Apoptosis." *Journal of Leukocyte Biology* 92(2): 249–58. <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0112008>.
- Vago, Juliana P. et al. 2021. "Exploiting the Pro-Resolving Actions of Glucocorticoid-Induced Proteins Annexin A1 and GILZ in Infectious Diseases." *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- Vanbervliet B, et al. (2003) The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med*. 198(5):823–830.
- Verdecchia, Paolo, Claudio Cavallini, Antonio Spanevello, and Fabio Angeli. 2020. "Since January 2020 Elsevier Has Created a COVID-19 Resource Centre with Free Information in English and Mandarin on the Novel Coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 Resource Centre Is Hosted on

Elsevier Connect , the Company ' s Public News and Information .” (January).

- Villalobos, Laura A. et al. 2016. “The Angiotensin-(1-7)/Mas Axis Counteracts Angiotensin II-Dependent and -Independent pro-Inflammatory Signaling in Human Vascular Smooth Muscle Cells.” *Frontiers in Pharmacology*.
- Walters III, Marshall C et al. 2003. “Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(1): 317–23.
- Watanabe, Satoshi, Michael Alexander, Alexander V. Misharin, and G. R.Scott Budinger. 2019. “The Role of Macrophages in the Resolution of Inflammation.” *Journal of Clinical Investigation* 129(7): 2619–28.
- Wittmann D. H. (1990). Intraabdominal infections--introduction. *World journal of surgery*, 14(2), 145–147. <https://doi.org/10.1007/BF01664866>.
- Yamamoto, Katsuhiko, Mark C. Chappell, K. Bridget Brosnihan, and Carlos M. Ferrario. 1992. “In Vivo Metabolism of Angiotensin I by Neutral Endopeptidase (EC 3.4.24.11) in Spontaneously Hypertensive Rats.” *Hypertension*.
- Yang, Penghui et al. 2014. “Virus-Induced Acute Lung Injury.” : 4–9.
- Yuan, Sarah Y., Qiang Shen, Robert R. Rigor, and Mack H. Wu. 2012. “Neutrophil Transmigration, Focal Adhesion Kinase and Endothelial Barrier Function.” *Microvascular Research*.
- Zaidan, Isabella et al. 2022. “Angiotensin- (1-7)/ MasR Axis Promotes Migration of Monocytes / Macrophages with a Regulatory Phenotype to Perform Phagocytosis and Efferocytosis.”
- Zhang, Wei et al. 2014. “Severe Sepsis: Low Expression of the Renin-Angiotensin System Is Associated with Poor Prognosis.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 7(5): 1342–48.
- Zhong, Xiancai et al. 2018. “Myc-Nick Promotes Efferocytosis through M2 Macrophage Polarization during Resolution of Inflammation.” *FASEB Journal* 32(10): 5312–25.
- Zhu, Ying et al. 2021. “Angiotensin (1-7) Attenuates Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Regulating the NF-KB Pathway.” *Frontiers in Pharmacology* 12(March): 1–10.
- Zou, Zhen et al. 2014. “Angiotensin-Converting Enzyme 2 Protects from Lethal Avian Influenza A H5N1 Infections.” *Nature Communications*.

ANEXO A – Artigo como primeira autora gerado durante o Doutorado

Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis

Isabella Zaidan, ... , Izabela Galvão, Lirlândia P. Sousa

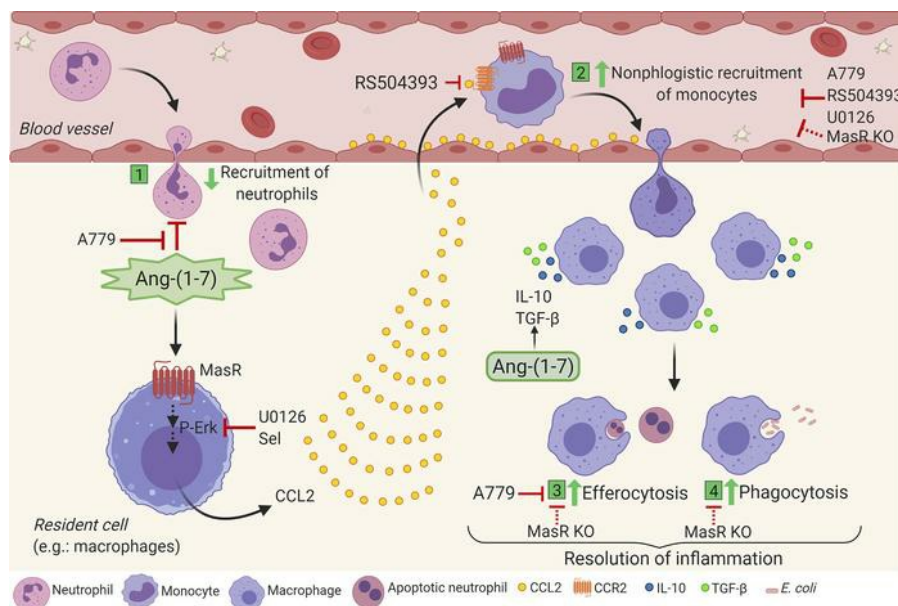
JCI Insight. 2022;7(1):e147819. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147819>.

Research Article

Infectious disease

Inflammation

Graphical abstract



Find the latest version:

<https://jci.me/147819/pdf>



Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis

Isabella Zaidan,¹ Luciana P. Tavares,^{2,3} Michelle A. Sugimoto,^{1,2} Kátia M. Lima,¹ Grazielle L. Negreiros-Lima,¹ Lívia C.R. Teixeira,¹ Thais C. Miranda,¹ Bruno V.S. Valiate,² Allysson Cramer,² Juliana Priscila Vago,^{1,2} Gabriel H. Campolina-Silva,^{2,4} Jéssica A.M. Souza,¹ Laís C. Grossi,¹ Vanessa Pinho,^{2,4} Maria Jose Campagnole-Santos,⁵ Robson A.S. Santos,⁵ Mauro M. Teixeira,² Izabela Galvão,² and Lirlândia P. Sousa^{1,2}

¹Signaling in Inflammation Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ²Immunopharmacology Laboratory, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ³Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA. ⁴Department of Morphology and ⁵Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Nonphlogistic migration of macrophages contributes to the clearance of pathogens and apoptotic cells, a critical step for the resolution of inflammation and return to homeostasis. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] is a heptapeptide of the renin-angiotensin system that acts through Mas receptor (MasR). Ang-(1-7) has recently emerged as a novel proresolving mediator, yet Ang-(1-7) resolution mechanisms are not fully determined. Herein, Ang-(1-7) stimulated migration of human and murine monocytes/macrophages in a MasR-, CCR2-, and MEK/ERK1/2-dependent manner. Pleural injection of Ang-(1-7) promoted nonphlogistic mononuclear cell influx alongside increased levels of CCL2, IL-10, and macrophage polarization toward a regulatory phenotype. Ang-(1-7) induction of CCL2 and mononuclear cell migration was also dependent on MasR and MEK/ERK. Of note, MasR was upregulated during the resolution phase of inflammation, and its pharmacological inhibition or genetic deficiency impaired mononuclear cell recruitment during self-resolving models of LPS pleurisy and *E. coli* peritonitis. Inhibition/absence of MasR was associated with reduced CCL2 levels, impaired phagocytosis of bacteria, efferocytosis, and delayed resolution of inflammation. In summary, we have uncovered a potentially novel proresolving feature of Ang-(1-7), namely the recruitment of mononuclear cells favoring efferocytosis, phagocytosis, and resolution of inflammation. Mechanistically, cell migration was dependent on MasR, CCR2, and the MEK/ERK pathway.

Authorship note: IZ and LPT contributed equally to this work.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Copyright: © 2022, Zaidan et al. This is an open access article published under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Submitted: January 19, 2021

Accepted: November 24, 2021

Published: December 7, 2021

Reference information: *JCI Insight*. 2022;7(1):e147819.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.147819>.

Introduction

The renin-angiotensin system (RAS) is traditionally viewed as an enzymatic cascade of reactions that culminate with the production of angiotensin II (Ang II), a hormone peptide that causes vasoconstriction and is endowed with potent proinflammatory actions (1). RAS activation is often associated with the pathological induction of inflammatory and profibrotic responses in different diseases (2, 3). Conversely, an alternative counterregulatory branch of the RAS was later described: the angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis. Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] is a bioactive heptapeptide produced through the enzymatic inactivation of Ang II by the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) (4, 5). In addition to directly inhibiting Ang II, the production and bioactions of Ang-(1-7) include potent receptor-mediated antiinflammatory responses triggered by the activation of the G protein-coupled receptor Mas (MasR) (6). Accordingly, MasR absence is associated with the aggravation of cardiovascular and inflammatory diseases (7–10).

The Ang-(1-7)/MasR axis was recently shown to mediate important features of resolution of inflammation, including apoptosis of neutrophils with subsequent efferocytosis, and decrease the secretion of proinflammatory cytokine and granulocyte recruitment (11–13). Nevertheless, the compelling tissue-protective and regulatory actions of Ang-(1-7) remain poorly explored. Understanding the specific proresolving mechanisms of Ang-(1-7) in leukocyte responses will shed light on critical therapeutic targets for inflammatory diseases.

Macrophages are key leukocytes promoting both inflammation onset and resolution (14, 15). The plasticity of macrophage response is evidenced by the distinct functional cell phenotypes determined by different tissue milieus (15, 16). Upon injury, activated macrophages rapidly produce significant amounts of cytokines, chemokines, and other mediators that promote inflammation. Once the inflammatory trigger is eliminated, macrophage phenotype is switched toward regulatory profiles and is more prone to perform efferocytosis of apoptotic cells and secrete antiinflammatory and proresolving mediators. Accumulating evidence indicates that the Ang-(1-7)/MasR axis deactivates proinflammatory macrophages (9, 12, 17, 18). For instance, MasR is expressed in different macrophage subtypes and negatively regulates the production of proinflammatory mediators (8, 9). Of note, the MasR ligand Ang-(1-7) significantly counterregulates LPS-induced proinflammatory macrophage responses (12, 17, 18). Although the role of Ang-(1-7)/MasR in the deactivation of proinflammatory macrophages has already been shown, the mechanisms by which Ang-(1-7) promotes nonphlogistic monocyte/macrophage migration, laying the foundation for inflammation resolution, remain unknown.

Here, we identified a potentially novel proresolving feature of Ang-(1-7), namely the nonphlogistic recruitment of macrophages. Ang-(1-7) signaling promoted macrophage migration, polarization to regulatory phenotypes, efferocytosis, and phagocytosis and induced resolution of inflammation through its cognate receptor, Mas, in models of sterile inflammation and infection. Mechanistically, Ang-(1-7)-induced cell migration alongside IL-10 and TGF- β release was dependent on the CCL2/CCR2 axis and activation of the MEK/ERK1/2 pathway.

Results

Ang-(1-7) promotes migration of macrophages and monocytes but not neutrophils. To explore the role of Ang-(1-7) on macrophage migration, we initially performed in vitro chemotaxis assays using RAW 264.7 macrophages. Ang-(1-7) induced a concentration-dependent macrophage migration when compared with untreated cells (Figure 1A). A concentration as low as 3 nM of Ang-(1-7) promoted significant macrophage chemotaxis, which was further raised by increasing concentrations of the peptide (Figure 1A). In addition, Ang-(1-7) induced in vitro migration of BM-derived macrophages (BMDMs) and human monocytes (Figure 1, B and C) to the same extent as the classical monocyte chemoattractant, CCL2. In contrast to its action on macrophages, Ang-(1-7) did not induce chemotaxis of human neutrophils, as observed for the positive control (*N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine — fMLP) (Figure 1D).

Next, we questioned whether pretreatment of macrophages and neutrophils with Ang-(1-7) would affect the in vitro migration toward phlogistic chemoattractants, mimicking cell recruitment in an inflammatory milieu. As anticipated, pre-exposure to Ang-(1-7) decreased the migration of macrophages (RAW 264.7 and BMDMs) and neutrophils toward the phlogistic stimuli LPS and fMLP, respectively (Figure 1, E–G). Notably, pretreatment of neutrophils with Ang-(1-7) decreased spontaneous migration of human neutrophils (toward control medium) (Figure 1G). Collectively, we have observed that monocyte/macrophages, but not neutrophils, migrated toward Ang-(1-7) in nonphlogistic conditions. In contrast, migration of neutrophils or macrophages toward inflammatory stimuli was prevented by pre-exposure to Ang-(1-7).

Ang-(1-7)-induced monocyte/macrophage migration is dependent on MasR, CCR2, and MEK/ERK1/2 pathway. Since Ang-(1-7) bioactions are mainly translated by MasR binding (6), we next evaluated the involvement of MasR in the Ang-(1-7)-induced macrophage migration. Pretreatment of RAW 264.7 macrophages with the antagonist of MasR, A779, abolished Ang-(1-7)-induced migration (Figure 2A). To validate our findings, we performed the migration assay using BMDMs from wild-type (WT) and MasR-knockout (MasR^{−/−}) mice. Likewise, MasR deficiency abrogated Ang-(1-7)-induced migration of murine macrophages (Figure 2B).

Monocyte/macrophage migration largely relies on the CCL2/CCR2 pathway (19). Importantly, proresolving molecules, such as plasmin and db-cAMP, significantly stimulate CCR2-dependent macrophage migration (16, 20). Here, Ang-(1-7) induced a significant production of CCL2 by macrophages (Figure 2C), and pretreatment with RS504393 (CCR2 antagonist) significantly reduced macrophage chemotaxis

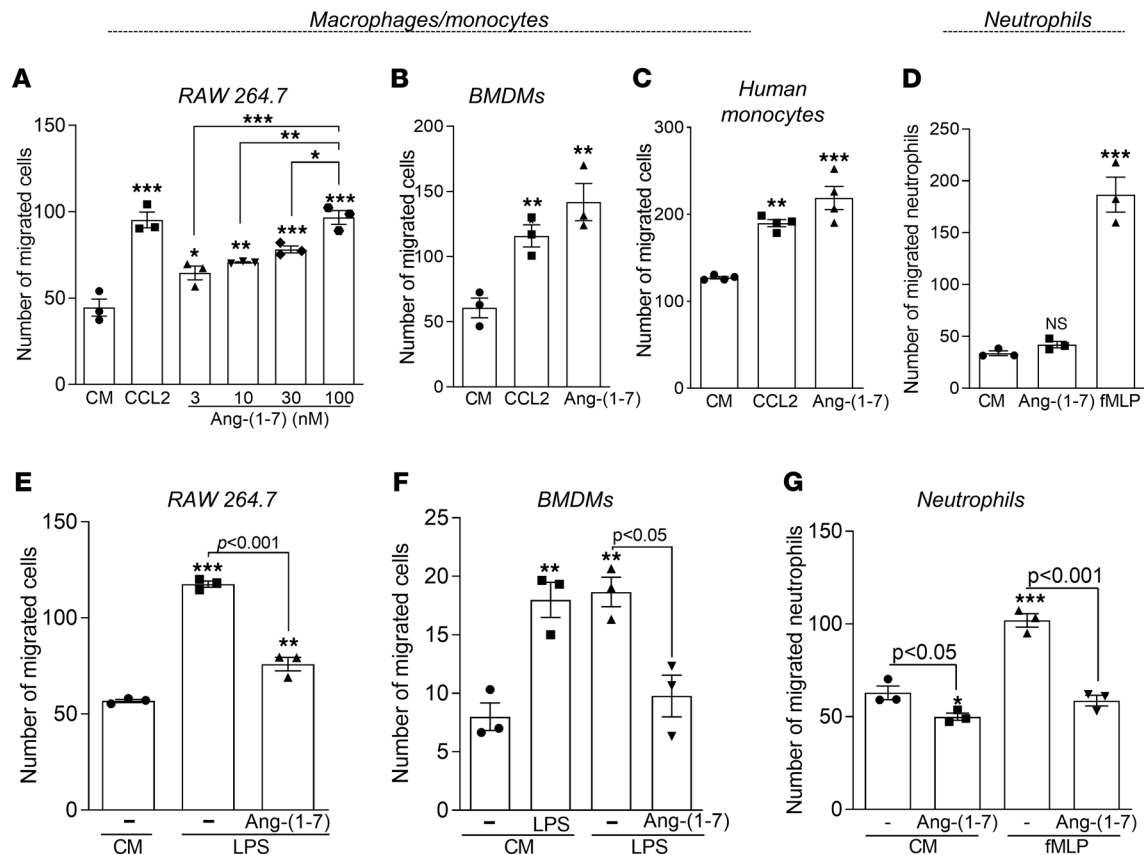


Figure 1. Macrophage and neutrophil chemotaxis after Ang-(1-7) treatment. RAW 264.7 cells (A), BMDMs (B), and human monocytes (C) were seeded in 24-transwell plates and allowed to migrate across a polycarbonate membrane using increasing concentrations of Ang-(1-7) as a chemoattractant (3–100 nM). CCL2 (100 ng) was used as a positive control. Chemotaxis assays using isolated human neutrophils were also performed using Ang-(1-7) (100 nM) or fMLP (10^{-9} M) as chemoattractants (D). Pretreatment of BMDMs (E), RAW 264.7 cells (F), and human neutrophils (G) for 1 hour with Ang-(1-7) 100 nM or media (RPMI) was performed to assess cell chemotaxis toward LPS (100 ng/mL) or fMLP (10^{-9} M/well) or control medium (CM) as specified in the graphs. Results are expressed as the number of migrated cells and are presented as mean $\pm$ SEM; * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, and *** for $P < 0.001$ when compared with the control group (CM) by 1-way ANOVA. Graphs A, B, E, and F are representative results of 3 independent experiments performed in biological triplicates ($n = 3$). Graphs C, D, and G represent data collected from different healthy volunteers ($n = 4$ for C and $n = 3$ for D and G).

toward Ang-(1-7) (Figure 2D). In agreement with that, BMDMs from $CCR2^{-/-}$ mice presented no migration toward either CCL2 or Ang-(1-7) (Figure 2E). Of note, whereas BMDMs from WT mice efficiently migrated toward low concentrations of CCL2 (1 ng/mL), a complete absence of migration toward a CCL2 gradient was observed for $MasR^{-/-}$ BMDMs (Figure 2F).

Next, we assessed the involvement of the MEK/ERK pathway in Ang-(1-7)-induced macrophage migration. MEK/ERK signaling is part of the cascade for cell migration in different contexts, including during resolution of inflammation (20, 21). Initial experiments revealed that Ang-(1-7) induced ERK1/2 phosphorylation — the kinase downstream to MEK (Supplemental Figure 1, A and B; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147819DS1>) — and pretreatment of macrophages with 2 MEK/ERK inhibitors, selumetinib and U0126, decreased Ang-(1-7)-induced phosphorylated (p-) ERK1/2 and macrophage migration (Figure 2, G–I). Activation of ERK1/2 by Ang-(1-7) was partially dependent on $MasR$, as A779 significantly decreased P-ERK1/2 levels in Ang-(1-7)-treated macrophages (Figure 2, H and I).

Ang-(1-7)/MasR axis promotes monocyte/macrophage migration in vivo. Having established the role of Ang-(1-7) in macrophage migration in vitro, we next examined Ang-(1-7) actions in vivo. Ang-(1-7) induced a time-dependent influx of leukocytes into the pleural cavity of mice (Figure 3A). Leukocyte infiltration was almost entirely composed of mononuclear cells without any significant recruitment of neutrophils. Likewise, Ang-(1-7) injected in the intra-articular cavity of mice induced a similar profile of leukocyte influx into the knee joint of mice (peak at 24 hours) (Supplemental Figure 2A).

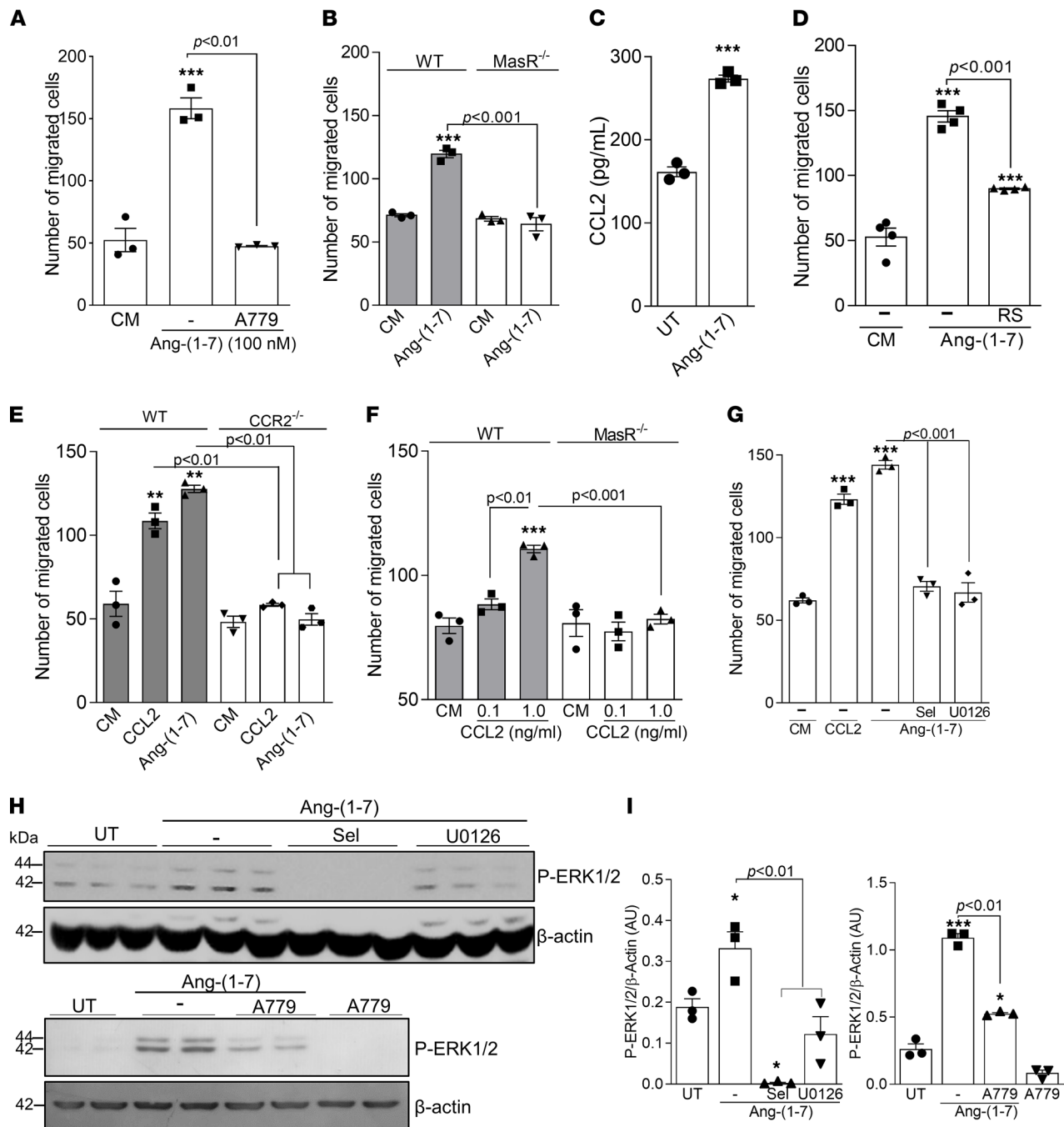


Figure 2. Ang-(1-7)-induced macrophage migration is dependent on MasR and associated with CCR2 and the MEK/ERK1/2 pathway. (A) RAW 264.7 cells were pretreated with the antagonist of MasR (A779, 1 μ M) 1 hour before performing chemotaxis assays using Ang-(1-7) (100 nM) as the chemoattractant. (B) BMDMs from WT and MasR^{-/-} mice were next used to assess cell chemotaxis toward Ang-(1-7). (C) Graph shows the production of CCL2 by WT BMDMs 4 hours post-Ang-(1-7) exposure. (D) RAW 264.7 cells were pretreated with CCR2 antagonist (RS504393 10 μ M) 1 hour before performing chemotaxis assays using Ang-(1-7) (100 nM) as the chemoattractant. (E) BMDMs from WT and CCR2^{-/-} mice were used to assess cell chemotaxis toward Ang-(1-7), and (F) a chemotaxis assay toward CCL2 (0.1 and 1 ng/mL) was performed using BMDMs from WT and MasR^{-/-} mice. (G) RAW 264.7 cells were pretreated for 1 hour with inhibitors of the MEK/ERK pathway (selumetinib and U0126, 10 and 15 μ M, respectively), and chemotaxis assays using Ang-(1-7) (100 nM) as the chemoattractant were performed. (H) Western blot analyses for p-ERK1/2 were performed after incubation of RAW 264.7 cells with the above-mentioned inhibitors followed by Ang-(1-7) treatment. β -Actin was used as a protein load control. (I) Quantification of blot bands was performed using ImageJ (NIH). Data are presented as mean $\pm$ SEM, * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, and *** for $P < 0.001$ when compared with the control group by 1-way ANOVA (A, B, and D–I) or 2-tailed t test (C). Data are representative of 3 independent experiments performed in biological triplicates or quadruplicates ($n = 3$ –4). CM, control medium; UT, untreated cells.

Ang-(1-7)-induced cell recruitment into the pleural cavity was associated with increased production of IL-10 and CCL2 (Figure 3B) without modifying the levels of CXCL1 and proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 (Supplemental Figure 2C). Similarly, increased CCL2 levels were associated with the recruitment of cells into the intra-articular cavity of mice post-Ang-(1-7) injection (Supplemental Figure 2B).

Additional immunophenotyping of cells recruited into the pleura showed enrichment in the frequency of monocytes 48 hours post-Ang-(1-7) (Figure 3, C and D) along with increased absolute numbers of macrophages, monocytes, and lymphocytes (Figure 3E). Both frequency and absolute numbers of neutrophils were not modified by Ang-(1-7) (Figure 3, D and E).

Akin to our *in vitro* data, pretreatment of mice with RS504393, or A779, decreased Ang-(1-7)-induced recruitment of mononuclear cells into the pleural cavity (Figure 4A). Given the critical role of the MEK/ERK pathway in the induction of CCL2-mediated macrophage migration (20, 22) and that Ang-(1-7) induced a time-dependent increase in ERK1/2 phosphorylation in leukocytes recruited to the pleura (Supplemental Figure 1, C and D), we treated mice with the MEK/ERK inhibitor U0126, 1 hour before Ang-(1-7) injection. Inhibition of the MEK/ERK pathway significantly reduced the recruitment of mononuclear cells observed at 48 hours post-Ang-(1-7) (Figure 4B). Of note, the Ang-(1-7)-mediated increase in CCL2 was also reduced by the inhibition of the MasR and MEK/ERK pathway (Figure 4, C and D). As expected, the pharmacological inhibition of MEK/ERK decreased the Ang-(1-7)-induced phosphorylation of ERK1/2 (Figure 4, E and F). Next, confocal microscopy experiments were performed to determine whether CCR2 receptor colocalized with MasR in Ang-(1-7)-recruited macrophages. Interestingly, an increased frequency of macrophages with concomitant expression of CCR2 and MasR was observed in the pleural cavity of mice 48 hours post-Ang-(1-7) injection (Figure 4G — arrows indicate the MasR⁺ CCR2⁺ cells). Together, these data provide evidence that Ang-(1-7), acting through MasR, activates the MEK/ERK pathway, leading to the production of CCL2 and recruitment of mononuclear cells via CCR2.

Macrophages recruited by Ang-(1-7) present regulatory phenotypes. Macrophage phenotype was evaluated based on 3 populations previously identified (23–25) (Figure 5A). Ang-(1-7) injection increased the numbers of M2 (F4/80^{hi}Ly6C[−]CD11b^{hi}) and proresolving macrophages (Mres — F4/80^{med}CD11b^{lo}) in the pleura of mice while numbers of classically activated (M1 — F4/80^{lo}Ly6C⁺CD11b^{med}) remained unmodified (Figure 5B). The regulatory phenotype of macrophages was consistent with the increased production of IL-10 (Figure 3B) and TGF- β (Figure 5C) observed post-Ang-(1-7) injection. Besides, Arginase 1 (Arg1) and Ym1, classical M2 markers, were increased in Ang-(1-7)-recruited leukocytes (Figure 5D). Of note, Ang-(1-7) also increased BMDMs' production of IL-10 and TGF- β in a time-dependent manner (Figure 5E).

Corroborating our *in vivo* data, Ang-(1-7) preferentially induced migration of M2-like macrophages (IL-4 polarized) while preventing migration of M1 cells (LPS+IFN- γ polarized) (Supplemental Figure 3).

MasR is crucial for the recruitment of mononuclear cells during resolution of inflammation. The relevance of endogenous Ang-(1-7)-induced migration of mononuclear cells was evaluated in a well-characterized self-resolving model of LPS-induced pleurisy (26–28). In this model, the intrapleural injection of LPS promotes early recruitment of neutrophils to the pleural cavity that peaks at 8 hours postchallenge, decreasing thereafter. At the resolution phase (48 hours post-LPS), a significant recruitment of mononuclear cells was observed concomitant with the decline in neutrophils' numbers (Figure 6, B and C). Notably, MasR expression in the pleural recruited leukocytes was significantly upregulated at this time point (Figure 6A).

Local administration of A779 at the peak of inflammation prevented the spontaneous reduction of neutrophil numbers (Figure 6B) and the increase of mononuclear cell recruitment (Figure 6C) seen at 48 hours in the vehicle group. These data reinforce that the endogenous Ang-(1-7)/MasR axis is indeed part of a proresolutive physiological program.

To further evaluate the role of MasR in the resolution of inflammation, we compared the kinetics of leukocyte infiltration after LPS challenge in MasR^{−/−} and WT controls. Although the genetic deficiency in MasR did not modify neutrophil infiltration post-LPS in the evaluated time points (Figure 6D), the number of mononuclear cells recruited to the pleural cavity was significantly lower in MasR^{−/−} compared with WT mice (Figure 6E). Accordingly, pleural levels of the chemokine CCL2 were significantly lower in MasR^{−/−} when compared with WT mice (Figure 6F). Flow cytometry (gating strategy — Supplemental Figure 4) showed lower numbers of macrophages, but not monocytes and neutrophils, in MasR^{−/−} in comparison with WT (Figure 6, G–I). Of interest, the frequency of CD206-positive macrophages, an M2 marker necessary for the engulfment of apoptotic bodies (29), was strikingly lower in the pleural exudate of MasR^{−/−} mice (Figure 6, J and K), indicating that MasR might affect macrophage

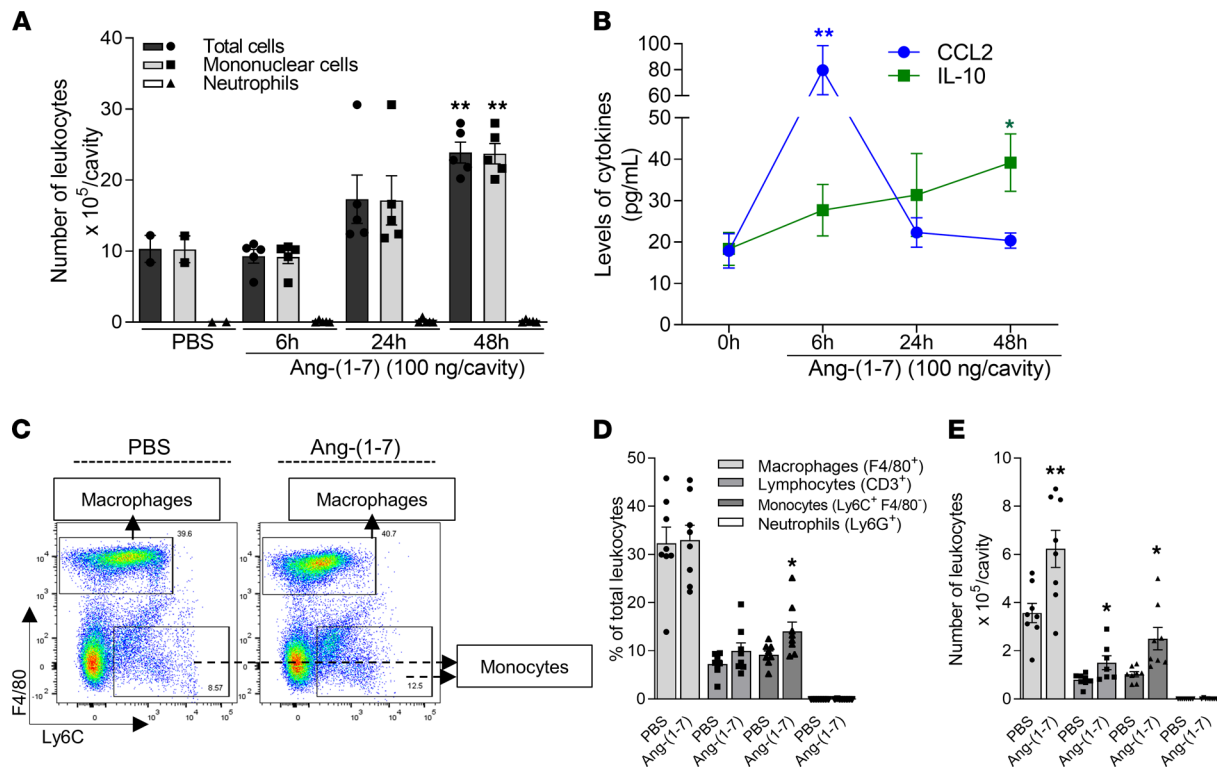


Figure 3. Ang-(1-7) induces time-dependent recruitment of monocytes/macrophages to the pleura of mice and increases IL-10 production. BALB/c mice received an intrapleural (i.pl.) injection of Ang-(1-7) (100 ng/cavity) or PBS (controls), and the cells recruited to the cavity were harvested at 6, 24, and 48 hours for total and differential leukocyte counts by light microscopy (**A**). Levels of CCL2 and IL-10 were measured by ELISA in the pleural lavage supernatants after PBS or Ang-(1-7) injections (**B**). Flow cytometry analysis of recruited leukocytes harvested 48 hours after Ang-(1-7) or PBS injection was also performed. Representative dot plots (**C**), leukocyte frequencies (expressed as the percentage of single cells), and leukocyte numbers are presented (**D** and **E**). Results are presented as mean $\pm$ SEM (graphs **A** $n = 5$, **B** $n = 6$, **D** and **E** $n = 8$), * for $P < 0.05$ and ** for $P < 0.01$ when compared with control (PBS), by 1-way ANOVA.

mechanisms for efferocytosis. To validate our findings, we tested whether the absence of MasR would influence the neutrophil clearance in a more severe model of inflammation. During severe pleurisy, MasR^{-/-} mice presented higher numbers of neutrophils during early stages (i.e., 8 hours postchallenge) and at the resolution phase of inflammation (48 hours postchallenge) compared with WT animals (Supplemental Figure 5A). Furthermore, we observed a decreased infiltration of macrophages at 8 and 24 hours post-LPS and a rebound of recruitment at 48 hours (Supplemental Figure 5B). Although macrophages did arrive late in MasR^{-/-} mice, they could not promote neutrophil removal from the pleural cavity at the 48-hour time point. This was accompanied by a lower frequency of efferocytic events in the MasR^{-/-} animals (Supplemental Figure 5C).

In sum, pharmacological and genetic inhibition of MasR uncovered its essential role in maintaining mononuclear cell migration, a key step for an effective resolution of inflammation.

Ang-(1-7)/MasR axis promotes production of CCL2, recruitment of macrophages, and phagocytosis of bacteria in a self-resolving model of peritonitis. To evaluate the role of MasR in infections, a self-resolving model of peritonitis was performed (30). Macrophage expression of MasR increased at the resolution phase (48 hours) but not at the peak (12 hours) of *E. coli*-elicited peritonitis (Figure 7A). Importantly, blockage of MasR at the peak of inflammation significantly delayed resolution of neutrophilic inflammation during *E. coli* peritonitis, as evidenced by the increased resolution interval observed (Ri = 22 hours in the vehicle group vs. Ri > 48 hours in the A779-treated group — Figure 7B).

Next, WT and MasR^{-/-} mice were infected intraperitoneally with *E. coli* and evaluated after different time points postinfection. In agreement with data from the pleurisy model, deficiency of MasR impaired the recruitment of macrophages during the resolution phase of *E. coli*-induced peritonitis, without altering neutrophil kinetics of recruitment into the peritoneal cavity (Figure 7, C and D). The reduced numbers of macrophages were associated with a significant reduction of CCL2 levels during infection (Figure 7E) and higher bacteria counts in the MasR^{-/-} mice in comparison with WT (Figure 7F).

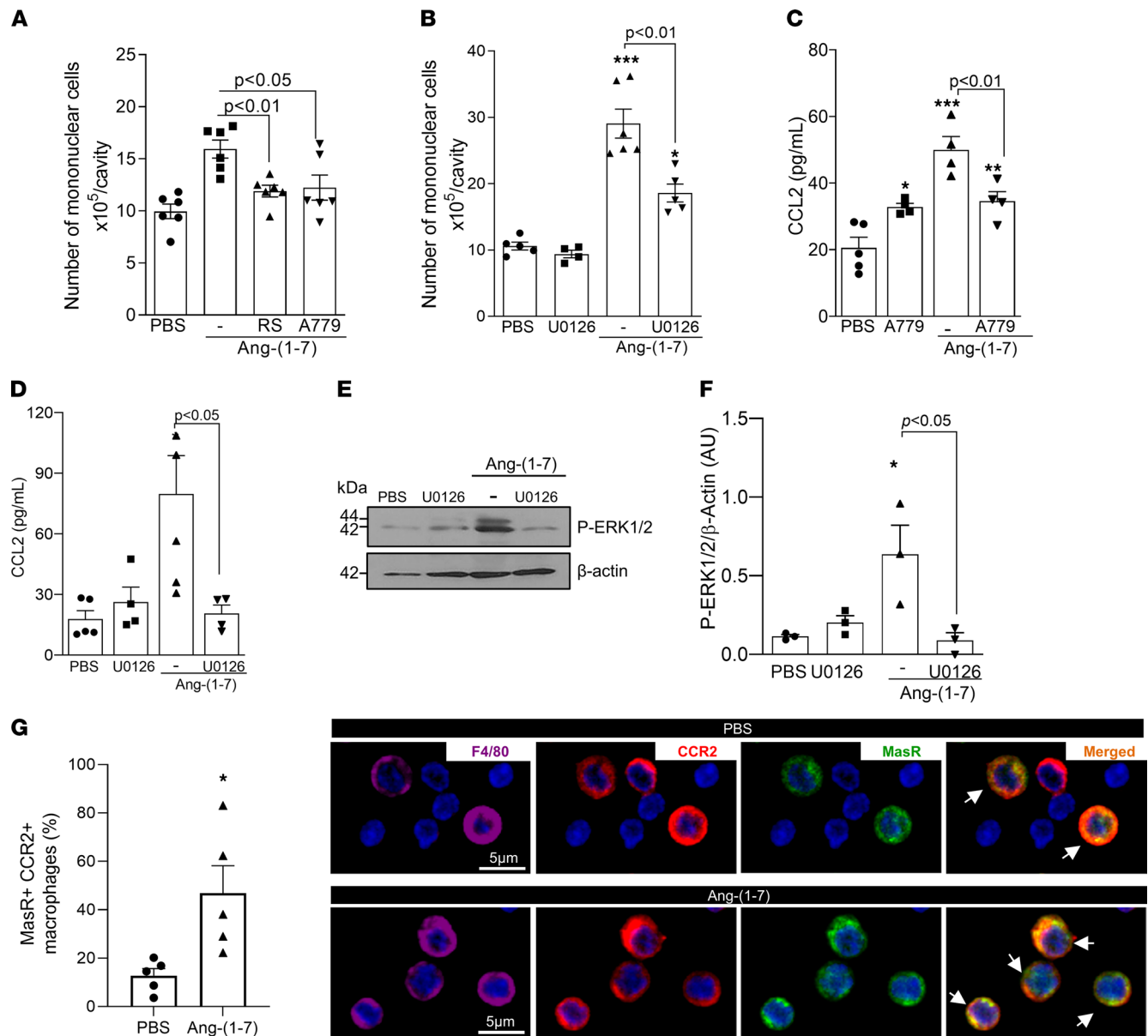


Figure 4. MasR, CCR2, and the MEK/ERK1/2 pathway are important for Ang-(1-7)-mediated recruitment of macrophages. BALB/c mice were treated with RS504393 (2 mg/kg i.p.), A779 (200 ng/cavity), or U0126 (60 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) 1 hour before the local injection of Ang-(1-7) (100 ng/cavity). Leukocyte recruitment to the pleura cavity was evaluated at 48 hours post-Ang-(1-7) (**A** and **B**). CCL2 levels were measured at 6 hours post-Ang-(1-7) in the cell-free pleural lavage supernatants (**C** and **D**). Phosphorylation of ERK1/2 was evaluated by Western blotting of recruited leukocytes at 48 hours post-Ang-(1-7) (**E** and **F**). At the same time point, frequencies of CCR2⁺MasR⁺ macrophages were determined by confocal microscopy (**G** – arrows indicate the double-positive cells). Results are shown as the mean $\pm$ SEM of $n = 4$ –6 mice in each group. * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, and *** for $P < 0.001$ when compared with the control group (PBS) by 1-way ANOVA (**A**–**F**) or t test (**G**).

To test whether Ang-(1-7)/MasR would impact macrophage ability to phagocytose bacteria, peritoneal macrophages from naive WT or MasR^{-/-} were isolated, and 2×10^5 cells from each group were plated for an in vitro phagocytosis assay (see Methods). Phagocytosis of *E. coli* was impaired by MasR deficiency (Figure 7G) and enhanced when BMDMs of WT mice were treated in vitro with Ang-(1-7) (Figure 7H). Besides the increased phagocytosis, Ang-(1-7) treatment did not enhance macrophage-related bacterial killing (Figure 7I). Of interest, Ang-(1-7) did not display direct classic antibacterial activity (Supplemental Figure 6). Altogether, Ang-(1-7):MasR is important for macrophage phagocytosis of bacteria, but it does not seem to impact the mechanisms for pathogen killing in macrophages. Thus, the higher bacteria loads observed in vivo in MasR^{-/-} mice compared with WT (evidenced in Figure 7F) are probably due to the decreased uptake of bacteria that, over time, leads to an overall delayed *E. coli* clearance.

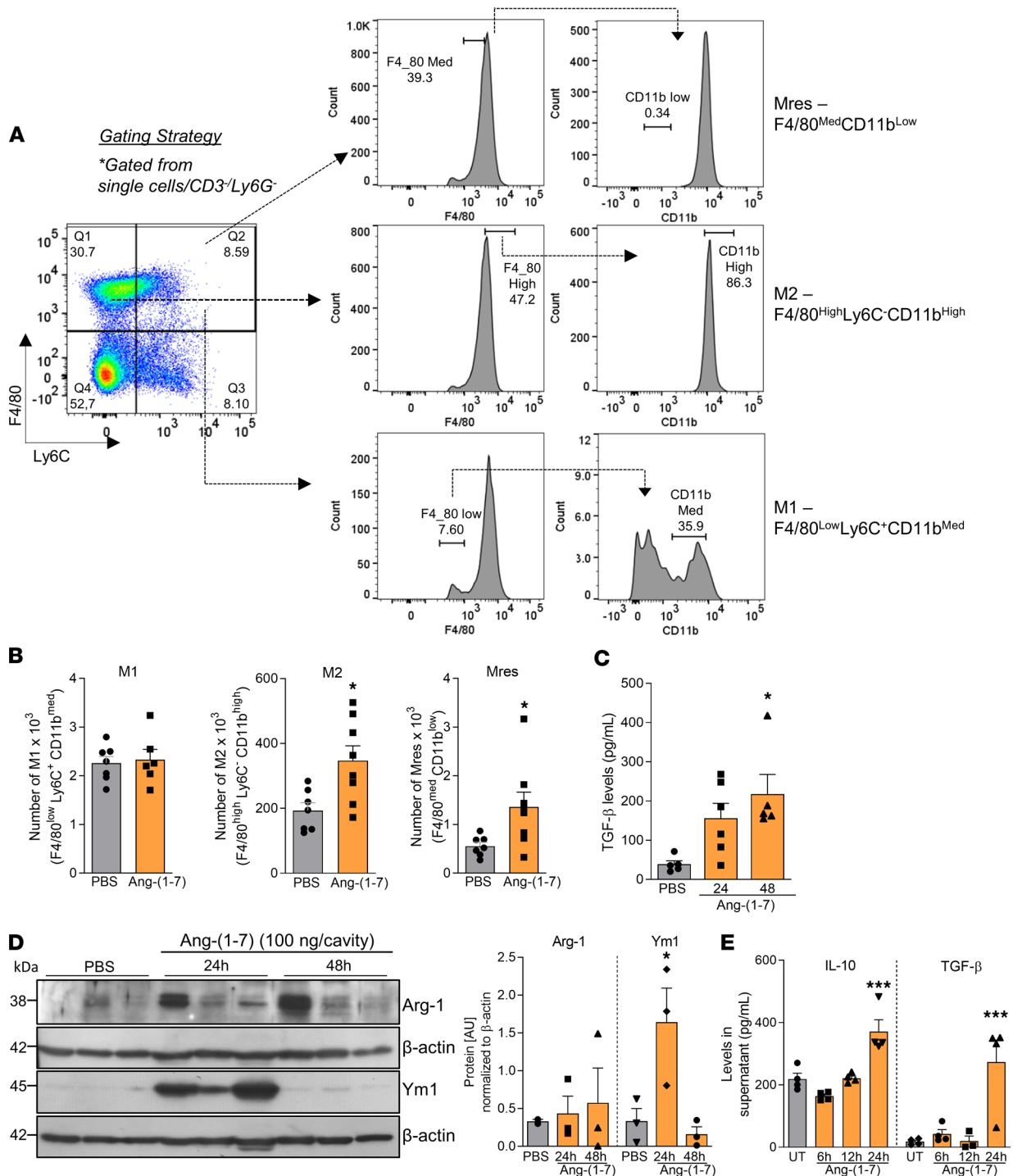


Figure 5. Macrophages recruited to the pleura post-Ang-(1-7) injection present a regulatory phenotype. Briefly, BALB/c mice received an i.p. injection of Ang-(1-7) (100 ng/cavity) or PBS (controls), and the macrophages recruited to the cavity were harvested at 48 hours for phenotyping by flow cytometry as shown in gating strategy (A). (B) Graphs present the absolute numbers of M1 (F4/80^{low}Ly6C⁺CD11b^{med}), M2 (F4/80^{hi}Ly6C⁺CD11b^{hi}), and Mres (F4/80^{med}CD11b^{lo}) recruited into the pleura. TGF- β levels were assessed in the pleural lavage supernatant from Ang-(1-7)-injected mice at different time points postinjection (C). Leukocytes recruited into the pleural cavity were processed for Western blot analysis of Arg-1 and Ym1 levels (D). β -Actin was used as a loading control. During in vitro settings, the kinetics of production of IL-10 and TGF- β by BMDMs were evaluated (E). Data are presented as mean $\pm$ SEM of 8 mice per group (in vivo) or are representative results of 3 independent experiments with BMDMs performed in biological quadruplicates ($n = 4$). Western blot quantification was performed using ImageJ software from the representative blots shown in D, which used whole cell extracts from 3 mice. * for $P < 0.05$ and *** for $P < 0.001$ when compared with the control group (PBS) by t test (B) or 1-way ANOVA (C and E).

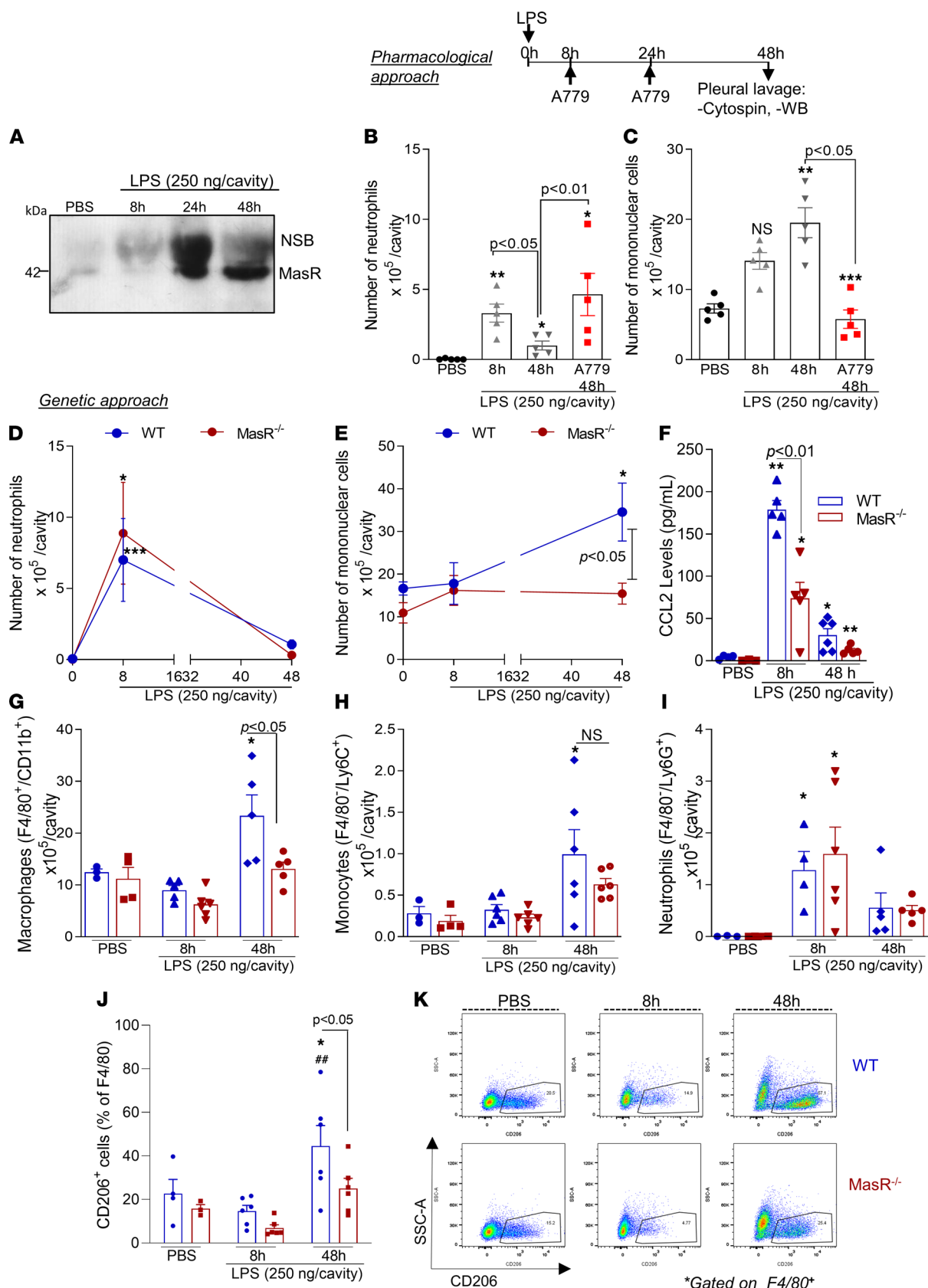


Figure 6. MasR is upregulated during the resolution of inflammation and is important for recruitment of regulatory macrophages. BALB/c mice were challenged with LPS (250 ng/cavity, i.p.) or PBS, and leukocytes from the pleural cavity were harvested after 8, 24, and 48 hours for Western blot analysis of MasR (A) and differential cell counts (B and C). LPS-challenged mice were treated with A779 (200 ng/cavity) or vehicle at 8 and 24 hours post-LPS injection, and leukocytes were harvested at 48 hours for differential cell counts (B and C). Next, WT and MasR^{-/-} mice were also i.p. challenged with LPS,

and neutrophil (D) and mononuclear cell numbers (E) and CCL2 levels (F) were evaluated. Flow cytometry analysis was performed to assess numbers of macrophages (F4/80⁺CD11b⁺ – G), monocytes (F4/80⁺Ly6C⁺ – H), and neutrophils (F4/80⁺Ly6G⁺ – I). Frequencies of CD206⁺ macrophages are graphed in J and representative gating is shown in K. Results are shown as the mean $\pm$ SEM of $n = 5$ –6 mice. * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, and *** for $P < 0.001$ when compared with the control group (PBS). ## for $P < 0.01$ when compared with the 8-hour time point, or as indicated, by 1-way ANOVA (B and C) or 2-way ANOVA (D–K). NSB, nonspecific band.

Ang-(1-7)/MasR axis is a regulator of efferocytosis in vivo and in vitro. Efferocytosis is a critical event in the resolution of inflammation (31). Previously, we have shown that Ang-(1-7) promotes efferocytosis of apoptotic neutrophils (11) and eosinophils (13); yet, the associated mechanisms remained unknown.

Because the frequency of CD206 was reduced in macrophages from MasR^{-/-} mice post-LPS challenge (Figure 6, J and K), we initially analyzed efferocytosis during this self-resolving model of pleurisy. In WT mice, the rate of neutrophil efferocytosis reflected the pattern of neutrophilic infiltration, being maximal at the peak of inflammation (8 hours) and decreasing thereafter (Supplemental Figure 7A). Although efferocytosis was relatively low at 48 hours post-LPS, the antagonism of MasR induced a further decrease in the frequency of efferocytosis (Supplemental Figure 7B). In addition, a lower frequency of macrophage efferocytosis was observed in MasR^{-/-} mice in comparison with WT mice during both models of self-resolving inflammation: LPS-induced pleurisy and *E. coli* peritonitis (Figure 8, A and B).

To validate our findings, we next performed a well-known efferocytosis assay by injecting prey apoptotic neutrophils into the peritoneal cavity of WT and MasR^{-/-} mice bearing 71-hour peritonitis elicited by zymosan (24, 25, 32). Once again, the engulfment of apoptotic neutrophils by MasR^{-/-} macrophages was lower when compared with WT cells (Figure 8C and representative slide images).

In agreement with our in vivo data, we observed a trend toward lower rates of efferocytosis in BMDMs from MasR^{-/-} (MFI of CFSE in F4/80⁺) in comparison with WT cells (Figure 8, D and E). The results gathered here provide mechanistic evidence that Ang-(1-7)/MasR enhances macrophage responses that are important for the resolution of inflammation, including recruitment of regulatory cells, phagocytosis of bacteria, efferocytosis, and production of regulatory cytokines (Figure 9).

Discussion

Resolution of inflammation is a time-regulated process that results in the termination of the inflammatory response to restore tissue homeostasis (33). Endogenous proresolving mediators orchestrate resolution by promoting apoptosis and efferocytosis of granulocytes, reducing the levels of proinflammatory mediators, and inducing the nonphlogistic recruitment and polarization of macrophages toward regulatory phenotypes (34). Understanding the mechanisms of action of proresolving molecules aids the development of new therapeutic opportunities for inflammatory diseases (35).

Ang-(1-7), initially identified as an inactive metabolite of Ang II (36), was recently shown to induce features of resolution of inflammation (11–13). Still, the mechanisms involved are poorly explored. Here, we have identified a potentially new proresolving feature of Ang-(1-7), namely the nonphlogistic recruitment of monocytes/macrophages. In summary, we have shown that Ang-(1-7) (i) induces migration of murine and human macrophages but not neutrophils, (ii) promotes CCL2/CCR2-dependent recruitment of mononuclear cells to the pleural cavity associated with secretion of the regulatory cytokines IL-10 and TGF- β , (iii) induces expression of M2-like markers in recruited macrophages, and (iv) is important for the clearance of bacteria and apoptotic cells promoting phagocytosis and efferocytosis, all critical features of the resolution of inflammation. In addition, (v) macrophages recruited by Ang-(1-7) presented concomitant expression of CCR2 and MasR, indicating that both pathways might be active in the same cell. Mechanistically, the Ang-(1-7)-mediated recruitment of macrophages was (vi) dependent on MasR and (vii) dependent on the activation of the MEK/ERK pathway upstream to CCL2 and CCR2.

Macrophages are extremely plastic cells that polarize to perform specific tasks depending on the cues from the tissue milieu — from inflammation induction to resolution (37). The contrasting functions of macrophages are related to the different cell phenotypes characterized by distinct expression of surface markers, metabolism programs, and production of mediators (15, 37, 38). Macrophages recruited during the early steps of inflammation are activated and secrete proinflammatory cytokines and other mediators, orchestrating the inflammatory process (37, 39). In contrast, once the inflammatory stimuli are neutralized/cleared, a shift in the production from inflammatory proresolving mediators takes place in the tissue (14). In addition to the reprogramming to a counterregulatory phenotype, significantly increased

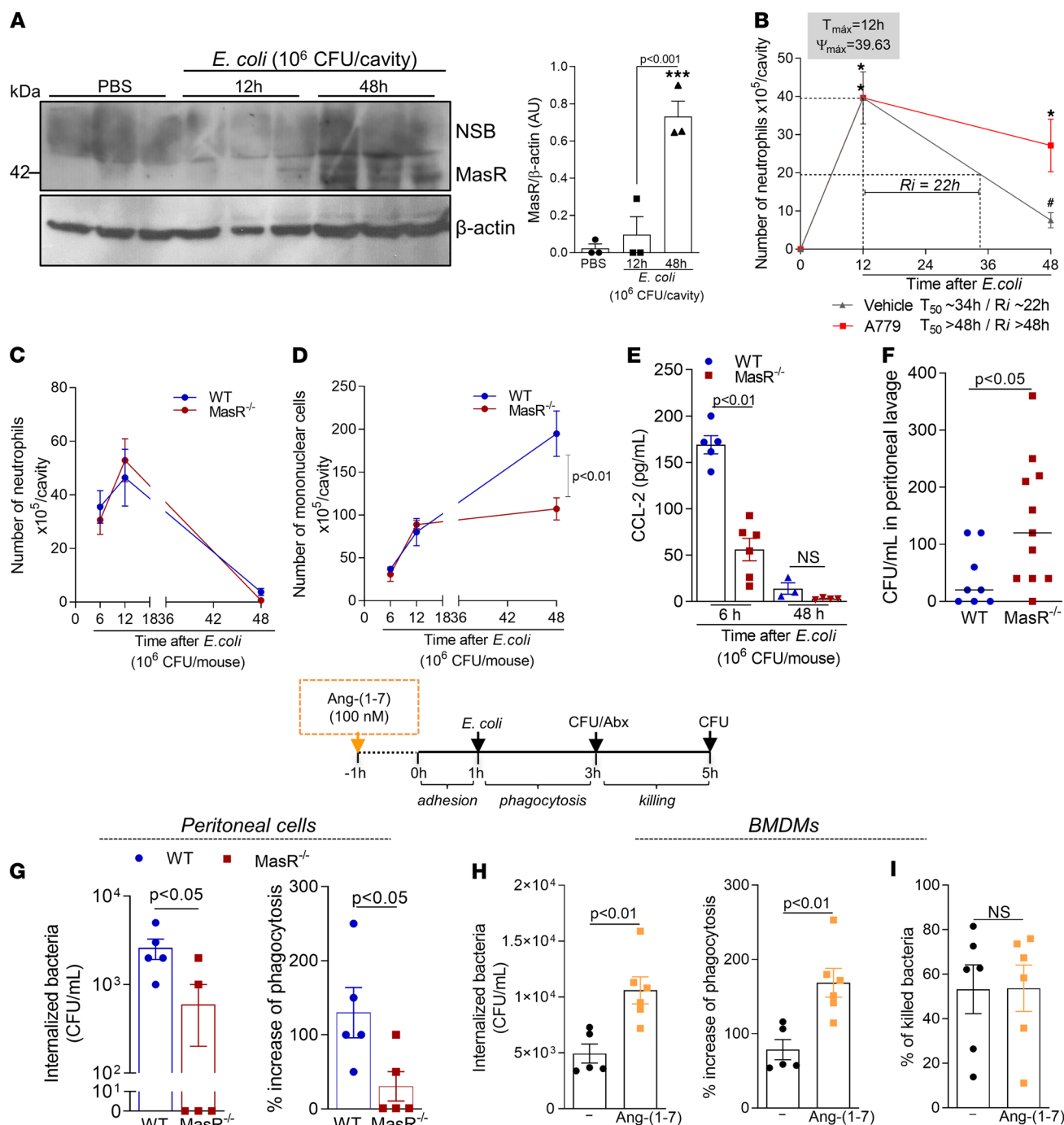


Figure 7. The Ang-(1-7)/MasR pathway promotes the recruitment of macrophages, production of CCL2, and phagocytosis of bacteria. WT mice were infected with *E. coli* (1×10^6 CFU), and macrophages were harvested at 12 and 48 hours postinfection for MasR expression (A, $n = 3$). Macrophages from PBS-injected mice were used as controls. Next, infected mice were treated with A779 (200 ng/cavity) or vehicle, and neutrophil numbers at 12 and 48 hours postinfection were evaluated to calculate the resolution intervals (R_i – B). T_{50} , time point when neutrophil numbers reduced to 50% of maximum ($n = 7$). In addition, WT and MasR $^{-/-}$ mice were infected, and the numbers of neutrophils (C) and macrophages (D) was evaluated at different time points postinfection. CCL2 levels were measured in the cell-free supernatants of the peritoneal lavages at 6 and 48 hours postinfection (E). (F) Graph shows the CFU numbers in the lavage at 6 hours postinfection ($n = 5-11$). Phagocytosis of bacteria was evaluated in peritoneal macrophages from naive WT and MasR $^{-/-}$ (G) or WT BMDMs pretreated with Ang-(1-7) – 100 nM (H). Results are expressed as CFU of internalized bacteria or percentage of phagocytosis ($n = 5-6$). In a parallel experiment, macrophages were incubated for another 2 hours after antibiotics to assess the killing of bacteria inside the macrophages by evaluating the number of viable bacteria (CFU counts in LB agar plates – I). Data are presented as the mean $\pm$ SEM, * for $P < 0.05$ and *** for $P < 0.001$, when compared with the control group (PBS), or # for $P < 0.05$ when compared with the A779-treated group, by 1-way ANOVA or t test (when comparing 2 groups).

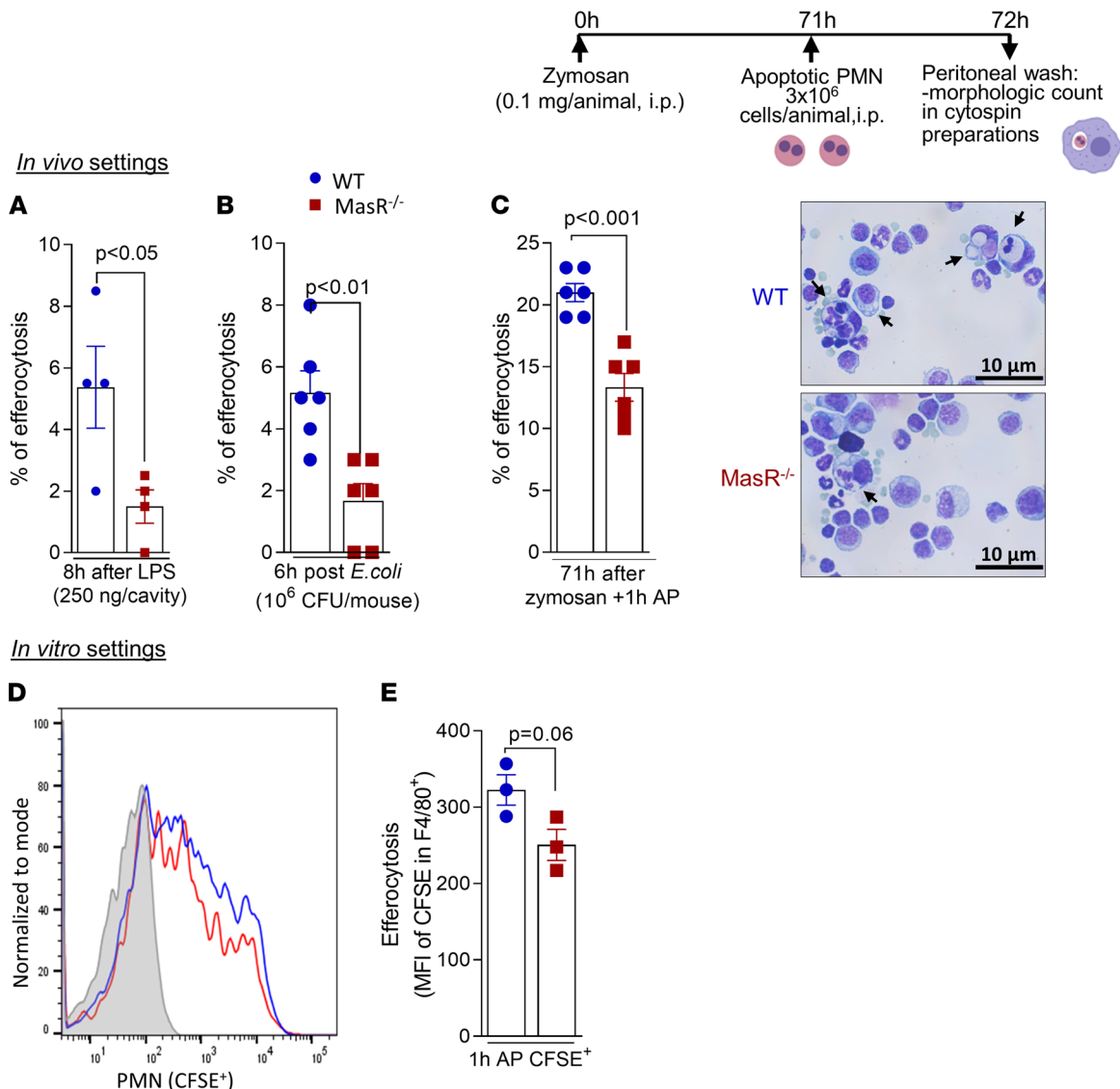


Figure 8. MasR is important for efferocytosis of apoptotic neutrophils. WT and MasR^{-/-} mice received an i.p. injection of LPS (250 ng/cavity) (A) or were infected with *E. coli* intraperitoneally (B), and efferocytosis was morphologically identified in cytopsin slides at 8 and 6 hours postchallenge, respectively. The frequency of efferocytosis was evaluated by counting 500 cells per slide. WT and MasR^{-/-} were also used for the efferocytosis assay post-zymosan intraperitoneal injection, as shown in experimental design above the figure. Percentage of efferocytosis was obtained by morphological identification in cytopsin slides (C). Representative images of the slides are shown in C. Original magnification, 100 $\times$. Arrows represent macrophages with engulfed apoptotic cells. Data are shown as the mean $\pm$ SEM of $n = 4$ –6 mice in each group. Lastly, CFSE-labeled neutrophils were coincubated with WT or MasR^{-/-} BMDMs for 1 hour, and flow cytometry was performed for efferocytosis evaluation (MFI of CFSE in macrophages – D and E). PMN, polymorphonuclear cell.

numbers of macrophages are usually observed in the tissue during resolution phase of inflammation (16). The proresolving macrophages are particularly important for the phagocytosis of bacteria/debris, for the efferocytosis of apoptotic granulocytes, and to mediate tissue regenerative responses (40). Traditionally, macrophages are artificially divided into M1 and M2 phenotypes, also known as classically or alternatively activated macrophages, respectively. In vivo, a distinct population of macrophages that appears in the inflammatory site during the resolution phase of inflammation was also identified and named Mres or proresolving macrophages (41). During resolution, M2 and Mres macrophages are important players (23, 42). Of interest, M2 macrophages are highly efferocytic and secrete antiinflammatory cytokines, including IL-10 and TGF- β (43, 44). The differences in macrophage responses/profiles are also noticed in the distinct mouse strains used for experimental research. For instance, BALB/c and C57BL/6 macrophages present a distinct magnitude of inflammatory responses to LPS (45). Nevertheless, here we observed a very similar

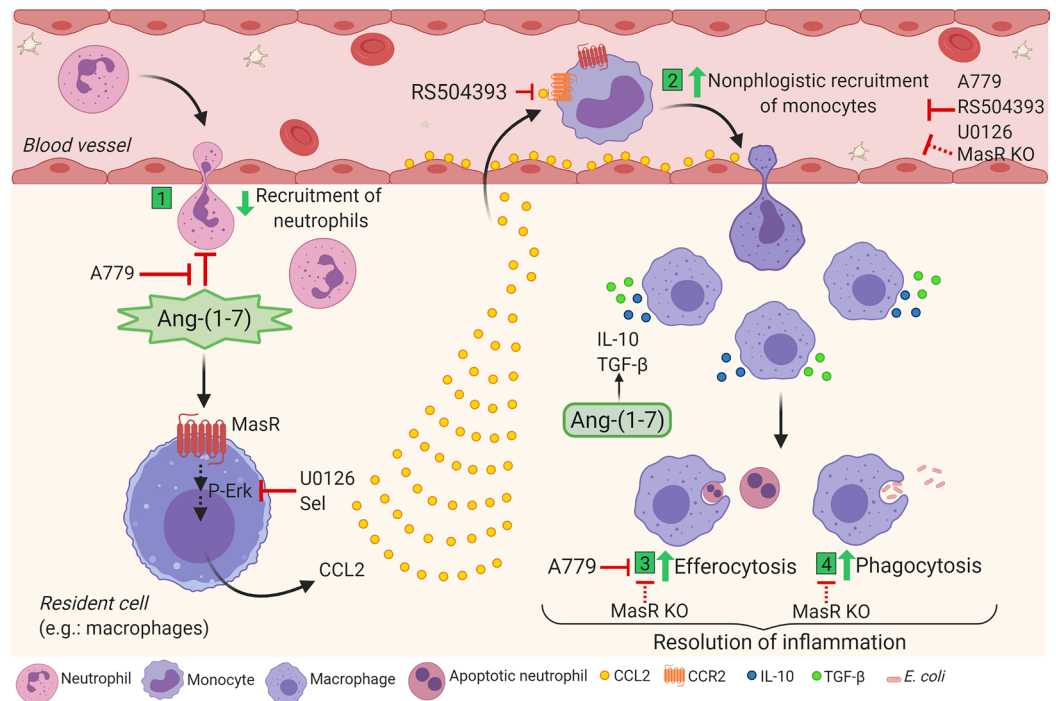


Figure 9. Schematic representation of Ang-(1-7) mechanisms in macrophage migration and function favoring resolution of inflammation. (1) Ang-(1-7) impairs the migration of neutrophils in a MasR-dependent way. (2) On the other hand, Ang-(1-7) signals through its MasR, culminating in the phosphorylation of ERK1/2 and production of CCL2, probably by resident cells. CCL2 binds to CCR2 receptor and promotes nonphlogistic monocyte migration, which can be abrogated by the blockage of CCR2 (RS504393), antagonism or absence of MasR (A779 and MasR knockout) or inhibition of ERK signaling (U0126). In addition, Ang-(1-7)/MasR takes part in the spontaneous resolution of acute inflammation induced by LPS or *E. coli* by promoting nonphlogistic migration of regulatory monocytes/macrophages and engaging in the removal of apoptotic neutrophils through efferocytosis (3) and bacteria through phagocytosis (4) and production of IL-10 and TGF-β. The proresolving effects summarized herein account for the endogenous role of Ang-(1-7) in the physiological resolution of inflammation. Note: red lines represent inhibitory effects. Created with BioRender.

migration response in both BALB/c and C57BL/6 mice and a comparable pattern in the self-resolving model used for our experiments, minimizing the possibility of a strain-specific effect in the immunological response observed (46).

CCL2 is a canonical macrophage chemoattractant. Increased CCL2 in MasR-deficient mice upon inflammatory stimulation or in the context of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was shown to promote the recruitment of inflammatory macrophages (9). On the other hand, CCL2 has been recognized as a crucial cytokine for the recruitment of monocytes and induction of M2/Mres macrophages' phenotypes (16, 47). Indeed, CCL2 was shown to induce polarization of human and murine macrophages to an M2 phenotype acting via CCR2 (48, 49) and enhances apoptotic cell removal by macrophages, activating this important proresolving cellular function (50). Proresolving agents such as cAMP and plasmin (16, 20, 24) mediate the nonphlogistic recruitment of macrophages in a CCR2:CCL2-dependent way. Therefore, given the continuum of phenotypes that macrophages present and that these cells can be activated by different environment cues, the role of CCL2:CCR2 in the polarization of macrophages to a specific phenotype is context dependent. Here, Ang-(1-7), acting through MasR, promoted a rapid secretion of CCL2 — as early as 4 hours after Ang-(1-7) exposure *in vitro* and 6 hours after *in vivo* injection — by monocytes/macrophages, enhanced the noninflammatory monocyte recruitment via CCR2, and increased efferocytosis, in agreement with previous reports (11). However, whether Ang-(1-7) directly or indirectly binds to CCR2 to induce chemotaxis is yet to be fully explored. In contrast, migration and activation of macrophages are inhibited by Ang-(1-7) in inflammatory conditions (ref. 18; Figure 1, E and F; and Supplemental Figure 3). Thus, the state of activation of cells and previous exposure to inflammatory stimuli determine Ang-(1-7) actions on macrophages. Several studies concur with ours in that Ang-(1-7) can deactivate proinflammatory macrophages (12, 17, 18, 51, 52), which could explain the decreased migration

toward an inflammatory stimulus observed in our results. Importantly, an increased frequency of MasR⁺CCR2⁺ macrophages was detected in the pleura of mice at 48 hours post-Ang-(1-7) injection. Prior reports show that MasR can modulate the activity of other receptors, such as AT1 and AT2, by hetero-oligomerization (53, 54). Although a direct interaction between MasR and CCR2 has not yet been described, here, we show that macrophages recruited post-Ang-(1-7) harbor both receptors, suggesting that the 2 pathways are active in the same cell and are contributing to the outcome observed: recruitment of monocytes that further turn into macrophages with proresolving actions. Numerous reports in the literature have already shown cooperation between receptors, leading to efficient chemotaxis of leukocytes. Indeed, a receptor for a given mediator can be critical for the chemotaxis of leukocytes toward a different mediator (that also binds to another receptor) (55–57). Here, we used suboptimal concentrations of CCL2 and observed that while CCL2 induces a significant increase in WT BMDMs' migration, BMDMs from MasR^{-/-} do not migrate toward CCL2. Therefore, our data suggest that Ang-(1-7) leads to CCL2 production and that CCR2 and MasR seem to act in cooperation, leading to macrophage migration toward Ang-(1-7) in the presence of CCL2. Additional studies will further elucidate the complete mechanisms by which MasR and CCR2 cooperate to induce migration.

Cellular migration requires specific intracellular signaling events, including the MEK/ERK pathway (20, 58–60). Here, this signaling pathway was critical for Ang-(1-7) actions as confirmed by in vitro and in vivo experiments. Ang-(1-7), most likely through MasR binding, induced the activation of the MEK/ERK pathway, which was associated with the production of CCL2 and recruitment of monocytes/macrophages. Our findings are in accordance with previous studies that observed MasR-dependent increased ERK1/2 phosphorylation after Ang-(1-7) (61). Of note, the ERK1/2 pathway has been suggested to promote regulatory actions in macrophages, enhancing the production of IL-10 by these cells (62).

In vitro and in vivo recruitment of monocytes/macrophages induced by Ang-(1-7) was accompanied by increased secretion of IL-10 and TGF- β , rather than the production of proinflammatory mediators (nonphlogistic). Akin with our results, IL-10 production was previously triggered by the agonism of MasR with Ang-(1-7) or derived peptides (17, 63). Also, the proresolving mediator lipoxin A₄ was shown to increase the production of IL-10 via the Ang-(1-7)/MasR axis in an experimental model of acute lung injury (64). Given the importance of IL-10 and TGF- β as markers of M2-like macrophages (65) and further induction of efferocytosis (66–69), we can suggest that induction of these regulatory cytokines by Ang-(1-7) might contribute to the promotion of efferocytosis and polarization to regulatory phenotypes of macrophages found in the tissue. Indeed, IL-10-producing macrophages are highly efferocytic (66), and Ang-(1-7)-recruited macrophages presented high expression of the classical M2 markers Arg1 and Ym1. Further evaluation of the cellular sources of IL-10 and TGF- β after Ang-(1-7) injection will more comprehensively uncover all the players involved in the induction of Ang-(1-7) antiinflammatory/proresolving actions.

In keeping with our results, BMDMs from MasR^{-/-} mice presented decreased expression of M2 markers in M2-differentiated (IL-4) macrophages, but increased expression of M1-related (IFN- γ /LPS) genes (9). In the same vein, we have previously found decreased expression of activation markers after exposure of M1 (IFN- γ /LPS) macrophages to Ang-(1-7), shifting the phenotype toward regulatory cells in vitro (12). Moreover, Ang-(1-7) treatment of LPS-inflamed mice promotes resolution of inflammation associated with decreased frequency of M1 macrophages into the pleural space (12). Of interest, we have observed a low-range expression of inducible NOS in pleural cells post-Ang-(1-7) injection into the pleura (data not shown). Given that Ang-(1-7)/MasR increased the phagocytic activity of macrophages to bacteria, we hypothesize that this mixed phenotype of macrophages induced by Ang-(1-7) preserves the macrophage antimicrobial responses while preventing exacerbations of inflammation. Indeed, previous studies have observed that harnessing this alternative branch of the RAS using agonists of MasR favors the phagocytic activity of dysfunctional neutrophils of diabetic animals (70). Our self-resolving model of *E. coli*-induced peritonitis replicated the findings from the LPS-induced pleurisy, supporting the important role of MasR inducing the CCL2-mediated migration of macrophages during the resolution phase of infection and clarifying its importance for macrophage phagocytosis of bacteria by aiding the resolution of infections. Recently, we have also shown that Ang-(1-7) decreases viral burden in the lungs during influenza A infection, without acting directly on the viral killing/inhibition (71). Here, in agreement with this previous study, we have shown that Ang-(1-7) did not present a direct antimicrobial effect to *E. coli*. Therefore, the protective effects of Ang-(1-7) are due to the modulation of the innate immune cells. In summary, despite inducing recruitment of monocytes/macrophages at steady-state conditions or during the resolution phase of inflammation, Ang-(1-7) significantly

reduces recruitment of neutrophils and inflammatory macrophages if administered to inflamed mice (10, 12, 52), while enhancing the antimicrobial potential of macrophages (72).

Neutrophils can be directly affected by Ang-(1-7) given MasR expression in these cells (11). Ang-(1-7) exposure to murine and human neutrophils significantly deactivates proinflammatory pathways of these cells (11). In addition, harnessing the MasR pathway was shown to reduce leukocyte rolling and adhesion in a model of arthritis, leading to reduced recruitment of neutrophils in the joint (10). In line with this, MasR^{-/-} mice present increased neutrophil activation markers, adhesion, and rolling during endotoxemia (8). All of this evidence suggests that the Ang-(1-7)/MasR axis is an important negative regulator of neutrophil activation, leading to reduced migration to the inflamed tissue. Our experimental data are in line with the prior studies and show that preincubating neutrophils with Ang-(1-7) prevents cell migration toward the inflammatory stimulus (here, fMLP was used as the chemoattractant), potentially due to the neutrophil deactivation mechanisms described previously (8, 10, 11). On the other hand, Ang-(1-7) does not present any chemoattractant activity for neutrophils as it does for macrophages.

In immune cells, MasR is expressed in low levels (<https://dice-database.org/genes/MAS1>) but can be dynamically regulated by inflammatory stimuli, such as LPS (18). MasR activation was shown to be protective during a severe model of LPS-induced systemic inflammation and other preclinical models of inflammation (9, 18, 73, 74). Here, we have shown that MasR expression was upregulated during the resolution phase of inflammation, around the time regulatory macrophages are enriched in the pleural cavity. In addition, macrophages isolated at the resolution phase of *E. coli* peritonitis presented increased levels of MasR expression. Pharmacological inhibition of MasR delayed resolution of inflammation and recruitment of mononuclear cells, suggesting that MasR expression takes part in an endogenous program of self-resolving inflammation. Indeed, our data gathered from MasR^{-/-} mice reinforce an endogenous role for Ang-(1-7)/MasR in macrophage migration. In agreement with the role of Ang-(1-7)/MasR in the resolution of inflammation, dexamethasone, a drug that induces different features of resolution (35, 46), was shown to increase MasR expression (75). In sum, here we have identified, for the first time to our knowledge, the dynamic of MasR expression during resolving inflammation, implicating the receptor as a key player in this response. ACE-2 is the enzyme that catalyzes the conversion of Ang II to Ang-(1-7). Moreover, ACE-2 expression has been extensively mapped recently and shows that different cell types can potentially produce Ang-(1-7), including tissue macrophages in the context of inflammation (76). Indeed, ACE-2 was also shown to be upregulated by proinflammatory cytokines (77). Therefore, while the circulating physiological concentration of Ang-(1-7) is relatively low (78, 79), the local concentrations of Ang-(1-7), especially during inflammation, might be different. Endothelial and epithelial cells are also known to produce Ang-(1-7) (80, 81). Although our study has not investigated what specific cells are producing Ang-(1-7), we can suggest that in the context of inflammation-activated immune cells, epithelial and endothelial cells may be major producers of this peptide.

Besides macrophages and neutrophils, we do not rule out that the MasR/Ang-(1-7) pathway might also affect function of other cell types. Indeed, resident cells such as epithelial cells also express MasR (82) and can contribute to the removal of apoptotic neutrophils favoring restoration of tissue homeostasis (83). In both self-resolving models used here, MasR^{-/-} mice presented similar neutrophil number to WT, unlike the results obtained by the pharmacological inhibition of the receptor. One can hypothesize that the complete absence of MasR (MasR^{-/-}) before and during a mild model of inflammation might be triggering resolution mechanisms for neutrophil removal, including efferocytosis by resident cells such as epithelial cells (83). In addition, the slight increase of macrophages observed in MasR^{-/-} at 8 hours (Figure 6E) or 12 hours (Figure 7D) postchallenge in both self-resolving models of inflammation might be sufficient to deal with the number of neutrophils observed in milder models of inflammation. Keeping with that, prior studies from our research group have shown that using the same self-resolving model of pleurisy, mice knocked out for GILZ, a proresolving protein induced by glucocorticoids, still resolved neutrophilic inflammation. Interestingly, this was associated with increased expression of annexin A1, another potent proresolving mediator (46). Similarly, annexin A1-knockout mice, a valuable tool to uncover annexin A1 proresolving mechanisms, can also resolve mild peritonitis elicited by zymosan at comparable rates to WT mice (84). Therefore, we believe similar mechanisms might be implicated here, and these will be further evaluated in future studies. In contrast to our mild model of pleurisy, increased and sustained numbers of neutrophils were observed in MasR^{-/-} mice, when compared with WT counterparts, after induction of a severe pleurisy (2.5 µg of LPS per cavity). Once again, macrophage numbers were significantly reduced in the early time points of pleural inflammation in MasR^{-/-} mice, while a rebound in the number of cells was observed at 48 hours post-LPS. Despite that, the

efferocytosis ability of these late recruited MasR^{-/-} macrophages was substantially reduced when compared with WT cells, suggesting those cells are from proinflammatory phenotype, as reported in an EAE model (9). Therefore, neutrophil numbers were continuously increased in MasR^{-/-} mice at the WT resolution time point (48 hours). In agreement with our results from a severe model of pleurisy, MasR^{-/-} mice subjected to endotoxemia by intraperitoneal injection of higher amounts of LPS also presented a larger recruitment of neutrophils to the brain pia mater alongside increased levels of CXCL1 (8). Therefore, the pharmacological inhibition of MasR activation during inflammation, rather than before it has started, might be a more precise strategy for determining the role of this pathway during the resolution phase of mild models of inflammation as used in our work. Keeping with that, pharmacological inhibition of MasR at the peak of inflammation delayed resolution of neutrophilic inflammation in both of our inflammatory models.

Altogether, our data suggest the following mechanism for the newly recognized proresolving feature of Ang-(1-7): the Ang-(1-7)/MasR axis triggers the MEK/ERK1/2 pathway, leading to the production of CCL2 that, through a potential cooperation with MasR, induces CCR2-dependent recruitment of monocytes and polarization of macrophages toward a regulatory phenotype associated with increased production of IL-10 and TGF- β and efferocytosis (Figure 9). In addition, in the context of infection, Ang-(1-7)/MasR enhances macrophage migration and phagocytosis, aiding pathogen clearance. Therefore, the present study provides evidence that the Ang-(1-7)/MasR axis is a crucial pathway for the resolution of inflammation. Given the pivotal role of inflammation in the pathogenesis of COVID-19 and the involvement of ACE-2, the biosynthetic enzyme for Ang-(1-7), in viral biology, therapeutic strategies focusing on the modulatory actions of Ang-(1-7) are of interest (85–88). The identification of mechanisms and proresolving actions of Ang-(1-7) will pave the way for the development of host-targeted therapies for different inflammatory diseases.

Methods

BMDMs. BM from tibias and femurs of C57BL/6 WT, CCR2^{-/-}, or MasR^{-/-} mice was collected, and BMDMs were differentiated as previously described (89) and plated accordingly for different experiments (16).

RAW 264.7 cell culture. Murine macrophages (RAW 264.7 cells, obtained from the American Type Culture Collection) were serum deprived overnight and used for in vitro cell migration assays or Western blot analysis.

Isolation of human PBMCs and neutrophils. Peripheral blood from healthy donors was used for neutrophil isolation using the Histopaque gradient protocol (Histopaque 1077 and 1119 — MilliporeSigma) as previously described (28). Healthy donors were recruited in the University Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais. PBMCs were obtained using the Ficoll-Paque PLUS protocol (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Monocytes were isolated by immunomagnetic negative selection (Easy-Sep Kit — StemCell Technologies).

Ang-(1-7) source and purity. Ang-(1-7) was purchased as a synthetic peptide from Bachem Inc., and purity (> 99%) was checked by the company using high-performance liquid chromatography. The peptide was diluted in endotoxin-free PBS, and solutions were tested by the *Limulus amoebocyte* lysate endotoxin assay (Pierce). LPS contamination was insignificant (<0.5 endotoxin units/mL or <0.05 ng).

In vitro cell migration experiments. Macrophage chemotaxis assays were performed in 24-transwell plates (Corning) with polycarbonate membranes of pore size of 5.0 μ m. Briefly, 5×10^5 of RAW 264.7 BMDMs or human monocytes were added to the upper compartment of each well, while the chemoattractants [CCL2 or Ang-(1-7)] or media (control) were added to the lower compartments. Plates were incubated at 37°C for 4 hours when membranes were fixed and stained for cell counts. CCL2 (100 ng/mL) was used as a standard chemoattractant (positive control). In specific experiments, cells were preincubated for 1 hour with the CCR2 antagonist RS504393 (10 μ M, Tocris Bioscience), the MasR antagonist A779 (1 μ M, Bachem), the MEK/ERK inhibitors selumetinib (Selleck Chemicals) or U0126 (Cell Signaling Technology) (10 and 15 μ M, respectively), or the vehicle of the drugs (DMSO 0.1%) and allowed to migrate toward Ang-(1-7) (100 nM). Similar experimental settings were utilized for cells plated onto 6-well plates (Corning, 1×10^6 cells/mL) that were next harvested for Western blot analysis. In additional experiments, RAW 264.7 cells and BMDMs were pretreated with Ang-(1-7) (100 nM), and migration toward LPS (100 ng/mL) or control media was evaluated as mentioned above.

For neutrophil migration assays, 5×10^5 cells were added to the upper parts of 24-transwell plates with polycarbonate membranes of pore size of 3.0 μ m. A total of 100 nM of Ang-(1-7) was added to the bottom part of the plate, and cells were allowed to migrate for 4 hours at 37°C. In another set of experiments,

neutrophils were pretreated with Ang-(1-7) (100 nM) 1 hour before the chemotaxis assay. In the latter experimental setup, RPMI (Cultilab) or fMLP (MilliporeSigma) (10^{-9} M in RPMI) was added to the lower compartments of the chamber. The system was incubated for 4 hours (37°C, 5% CO₂), after which the membrane from the well inserts was removed, fixed, and stained for cell counts.

For both assays, leukocytes were counted under a light microscope (IX70 Olympus), and the average of counts in five 100× high-power fields was reported. Three technical replicates were performed, and the entire experiment was repeated at least 3 times.

Migration of polarized macrophages. To induce macrophage polarization to M1-like or M2-like phenotypes, BMDMs were exposed for 24 hours to mouse recombinant proteins as follows: IFN- γ (10 ng/mL) + LPS (10 ng/mL) to induce M1-like phenotype or IL-4 (20 ng/mL) to induce M2-like macrophages (16). M0 cells were exposed to complete RPMI only. Next, 5×10^5 cells were transferred to 24-transwell plates, and the migration assay toward Ang-(1-7) was performed.

In vitro production of cytokines. BMDMs from WT C57BL/6 mice were washed out with RPMI without serum and later incubated with 100 nM of Ang-(1-7) or RPMI (untreated). At 6, 12, and 24 hours post-treatment, supernatant was harvested for evaluation of IL-10 and TGF- β by ELISA. Supernatant CCL2 levels were evaluated at 4 hours post-Ang-(1-7) exposure.

Ang-(1-7)-induced leukocyte migration in vivo. Ang-(1-7) or PBS was locally injected in the pleura of BALB/c mice (100 ng/cavity). At 6, 24, and 48 hours postinjection, pleural lavage was performed to harvest the recruited leukocytes. Flow cytometry was used to validate microscopy findings at 48 hours postinjection. Next, pharmacological inhibition of CCR2, MasR, and the MEK/ERK pathway was achieved using RS504393 (2 mg/kg, i.pl.), A779 (200 ng/cavity, i.pl.) or U0126 (60 μ g/cavity, i.pl.), respectively, 1 hour before Ang-(1-7) injection. Pleural lavages were performed, and recruited leukocytes were harvested for differential counting or Western blot analysis. CCL2 levels were evaluated by ELISA at different time points or at 6 hours (when inhibitors were used) post-Ang-(1-7) exposure.

Additionally, BALB/c mice received intra-articular injections of Ang-(1-7) (100 ng/cavity) or PBS into their tibiofemoral knee joint. At different time points, the articular cavity was washed 3 times with 5 μ L of PBS for total and differential leukocyte counts. Periarticular tissue was removed for chemokine evaluation by ELISA.

Models of LPS-induced pleurisy. BALB/c and C57BL/6 WT or MasR-knockout (MasR^{-/-}) mice (supplied in-house) were i.pl. injected with LPS (mild inflammation: 250 ng/cavity or severe inflammation: 2.5 μ g/cavity) as described (16, 24). At 8, 24, and 48 hours post-LPS, pleural leukocytes were harvested from BALB/c challenged mice for total and differential cell counts and Western blot analysis of MasR expression. In addition, LPS-challenged BALB/c mice (250 ng/cavity) were locally treated with A779 (200 ng/cavity) or vehicle (PBS) at 8 and 24 hours post-LPS injections. Recruited leukocytes were analyzed at 48 hours post-LPS.

At 8 and 48 hours post-LPS, MasR^{-/-} and C57BL/6 WT mice were euthanized for leukocyte recruitment evaluation by microscopy (total and differential leukocyte counts and efferocytosis assessment) and flow cytometry.

E. coli-induced peritonitis. BALB/c and C57BL/6 WT or MasR-knockout (MasR^{-/-}) mice were intraperitoneally infected with 1×10^6 CFU of *E. coli* (ATCC 25922). At 6, 12, and 48 hours postinfection, peritoneal leukocytes were harvested for total and differential cell counts. Number of efferocytosis events was obtained by counting macrophages that ingested apoptotic neutrophils (500 cells/slide were counted) (24, 25). CCL2 levels were evaluated in the supernatants of the peritoneal lavages by ELISA. Bacterial loads were determined by plating the peritoneal lavage harvested at 6 hours postinfection in LB agar (USB Corporation) plates (37°C incubation, overnight). Western blot analysis was performed from macrophages harvested from PBS-injected or infected mice at 12 and 48 hours post-*E. coli* by adherence exclusion.

Resolution intervals for E. coli peritonitis. BALB/c mice were intraperitoneally infected with 1×10^6 CFU of *E. coli* (ATCC 25922) and were treated with A779 (200 ng/cavity) or vehicle (PBS) at 12 hours and 24 hours postinfection. Resolution intervals were calculated by determining the time interval from the maximum neutrophil numbers to the 50% reduction point.

Phagocytosis assays. Phagocytosis was evaluated as previously done (90). Briefly, 2×10^5 peritoneal macrophages or BMDMs isolated from naive mice were plated and incubated with *E. coli* (MOI 1:10) for 3 hours to allow phagocytosis (1 hour of adhesion at 4°C followed by 2 hours at 37°C). Noninternalized bacteria were washed out with gentamycin (Gentatec, Chemitec; 5 μ g/mL in PBS, 30 minutes). To assess phagocytosed bacteria, macrophages were lysed as described (90), and viable internalized bacteria were

counted in LB agar plates after incubation (37°C, overnight). For the killing assay, macrophages were incubated for an extra 2 hours postincubation with gentamycin; then cells were lysed and viable bacteria were counted as described before (70).

Flow cytometry. Leukocytes were stained with the following antibodies: F4/80 (BM8)-PEcy7 (BioLegend), Ly6C (AL-21)-APCCy7, Ly6G (1A-8)-APC, CD11b (M1/70)-BV421, CD206 (19.2)-APC, and CD3 (SK7)-BV421 (BD Biosciences). Total macrophages (F4/80⁺), monocytes (Ly6C⁺F4/80⁺), neutrophils (Ly6G⁺), and lymphocytes (CD3⁺) were evaluated. Events were acquired in FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo Software (Tree Star Inc.). Macrophage phenotypes were defined by the expression of F4/80, CD11b, Ly6C, and CD206, as described previously (16, 25).

ELISA. Levels of IL-10, TGF- β , CCL2, CXCL1, TNF- α , and IL-6 were measured in the supernatants obtained from pleural and peritoneal lavages, cell culture-free supernatants and/or periarticular tissue homogenates. ELISA was performed using commercially available antibodies according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems).

Western blotting. Western blot was performed as previously done (25, 26). Samples were electrophoresed on denaturing 10% polyacrylamide SDS gels followed by transfer to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1 hour with 5% of nonfat dry milk solution (PBS 0.1% Tween-20) and incubated overnight with anti-p-ERK1/2 (1:1000 — 4377-197G2, Cell Signaling Technology), anti-MasR (MAS1L 1:500 — ab200685 Abcam), anti-Arg-1 (1:1000, sc-20150 — H52, Santa Cruz Biotechnology), anti-Ym1 (60130, 1:1000 — StemCell Technologies), or anti- β -actin (1:3000, A5316 — AC-74, MilliporeSigma). Secondary anti-rabbit (7074, Cell Signaling Technology) or anti-mouse (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) HRP-conjugated antibodies (1:3000) were added to the membranes for further incubation of 1 hour at room temperature. ECL detection system (GE Healthcare, now Cytiva) was used to visualize immunoreactive bands. Membranes were scanned and densitometry analysis of the bands was performed using ImageJ software. Results were expressed as arbitrary units and normalized using β -actin levels as loading controls.

Immunofluorescence. Cells were fixed (2% buffered paraformaldehyde) 48 hours post-Ang-(1-7) injection (i.pl. 100 ng/cavity), washed, and permeabilized (0.5% Triton X-100 in PBS). Nonspecific antibody bindings were prevented by blocking the samples with nonimmune 5% goat serum and 5 μ g/mL mouse BD Biosciences Fc Block. Primary antibodies — PE-conjugated anti-CCR2 (LS132.1D9 1:50 — R&D Systems), APC-conjugated rat anti-F4/80 (T45-2342 1:50 — BD Biosciences), and rabbit anti-MasR (MAS1L ab200685 1:200 — Abcam) — were incubated overnight at 4°C. Negative controls were established by omitting primary antibodies. After washing, cells were exposed for 1 hour at room temperature to the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (ab150077 1:100 — Abcam) and stained with DAPI (1 μ g/mL, MilliporeSigma). The fluorescent signals were evaluated using an inverted Nikon Eclipse Ti confocal microscope coupled to an A1 scanning head. For each sample, the percentage of F4/80⁺ macrophages expressing CCR2 and MasR was estimated in 10 randomly selected pictures at 200 $\times$ original magnification by using the Nikon NIS-Elements cell counter.

Efferocytosis assay. Isolated neutrophils from peripheral blood of healthy donors were incubated with 10 μ M of staurosporine (MilliporeSigma) for 1 hour to induce apoptosis (verified by flow cytometry using annexin V-FITC and propidium iodide staining). Apoptotic neutrophils were labeled with 5 μ M CFSE (37°C and 5% CO₂ for 1 hour). Next, WT and MasR^{-/-} BMDMs were cocultured for 1 hour with CFSE-labeled neutrophils in a proportion of 3 apoptotic neutrophil:1 macrophage. Flow cytometry was performed and efferocytosis was evaluated (MFI of CFSE⁺ cells in F4/80⁺) (16, 25).

Efferocytosis was also assessed as previously described (24, 25). At 71 hours post-zymosan injections (0.1 mg/mouse, i.p.), WT and MasR^{-/-} mice received 3 $\times$ 10⁶ apoptotic human neutrophils intraperitoneally. One hour later, peritoneal leukocytes were harvested for efferocytosis quantification by microscopy analysis of cytospin slides (500 cells/slide were counted). Results are expressed as the frequency of macrophages that ingested apoptotic neutrophils.

Data availability. Data sets generated are available in the current manuscript and supplemental materials file.

Statistics. Data were analyzed by 1-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test, or 2-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparisons test (difference between backgrounds) or Tukey's multiple comparisons test (differences between time points). When only 2 groups were evaluated, a 2-tailed *t* test was used. A value of *P* < 0.05 was considered significant. Results were presented as mean $\pm$ SEM. Statistical calculations were performed using GraphPad Prism 6.0.

Study approval. Experiments had prior approval from the Animal Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CEUA, protocol number: 295/2018) and Research Ethics Committee of UFMG, for human cell studies (COEP, protocol number 0319.0.203.000-11). Male BALB/c mice (8–10 weeks) obtained from the local animal facility were maintained under standard housing conditions. C57BL/6 WT mice, MasR-knockout mice (MasR^{-/-}, generated as previously described in ref. 91), and CCR2-knockout mice (CCR2^{-/-}, generated as described in ref. 19) were bred and maintained at the local animal facility at UFMG.

Author contributions

LPS, IZ, MAS, IG, and LPT analyzed data and wrote the paper. IZ, MAS, KML, GLNL, LCRT, BVSF, AC, JPV, GHCS, JAMS, TCM, and LCG performed the experiments and analyzed data. VP, MJCS, RASS, and MMT provided expertise and improvements and helped with paper discussion. RASS and MJCS provided the MasR-knockout mice. LPS designed research. LPT and IZ have contributed equally to the technical and scientific aspects of the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments

We thank Frankcineia Assis and Ilma Marçal for technical assistance. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 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; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

Address correspondence to: Lirlândia P. Sousa, Av. Antônio Carlos, 6627 Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. Phone: 55.31.3409.6883; Email: lipsousa72@gmail.com.

1. Marchesi C, et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(7):367–374.
2. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:439–465.
3. Simoes e Silva AC, et al. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2013;169(3):477–492.
4. Bader M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch.* 2013;465(1):79–85.
5. Jiang F, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(7):413–426.
6. Santos RA, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8258–8263.
7. Santos RA, et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension.* 2006;47(5):996–1002.
8. Oliveira-Lima OC, et al. Mas receptor deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced cerebral and systemic inflammation in mice. *Immunobiology.* 2015;220(12):1311–1321.
9. Hammer A, et al. Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(49):14109–14114.
10. da Silveira KD, et al. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J Immunol.* 2010;185(9):5569–5576.
11. Barroso LC, et al. Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Front Immunol.* 2017;8:1596.
12. de Carvalho Santuchi M, et al. Angiotensin-(1-7) and alamandine promote anti-inflammatory response in macrophages in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:2401081.
13. Magalhaes GS, et al. Angiotensin-(1-7) promotes resolution of eosinophilic inflammation in an experimental model of asthma. *Front Immunol.* 2018;9:58.
14. Watanabe S, et al. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 2019;129(7):2619–2628.
15. Shapouri-Moghaddam A, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425–6440.
16. Negreiros-Lima GL, et al. Cyclic AMP regulates key features of macrophages via PKA: recruitment, reprogramming and efferocytosis. *Cells.* 2020;9(1):128.
17. Liu M, et al. Direct anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) on microglia. *J Neurochem.* 2016;136(1):163–171.
18. Souza LL, Costa-Neto CM. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *J Cell Physiol.* 2012;227(5):2117–2122.
19. Kuziel WA, et al. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(22):12053–12058.
20. Carmo AA, et al. Plasmin induces in vivo monocyte recruitment through protease-activated receptor-1-, MEK/ERK-, and CCR2-mediated signaling. *J Immunol.* 2014;193(7):3654–3663.
21. Aoki K, et al. Propagating wave of ERK activation orients collective cell migration. *Dev Cell.* 2017;43(3):305–317.

22. Geest CR, et al. Tight control of MEK-ERK activation is essential in regulating proliferation, survival, and cytokine production of CD34+-derived neutrophil progenitors. *Blood*. 2009;114(16):3402–3412.
23. Schif-Zuck S, et al. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol*. 2011;41(2):366–379.
24. Sugimoto MA, et al. Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. *Blood*. 2017;129(21):2896–2907.
25. Vago JP, et al. Plasminogen and the plasminogen receptor, Plg-R_{KT}, regulate macrophage phenotypic, and functional changes. *Front Immunol*. 2019;10:1458.
26. Lima KM, et al. The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1. *J Biol Chem*. 2017;292(33):13758–13773.
27. Sousa LP, et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):895–904.
28. Vago JP, et al. Proresolving actions of synthetic and natural protease inhibitors are mediated by annexin A1. *J Immunol*. 2016;196(4):1922–1932.
29. Korn D, et al. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol*. 2011;2:57.
30. Chiang N, et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature*. 2012;484(7395):524–528.
31. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273(1):357–370.
32. Newson J, et al. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*. 2014;124(11):1748–1764.
33. Sugimoto MA, et al. Resolution of inflammation: what controls its onset? *Front Immunol*. 2016;7:160.
34. Sugimoto MA, et al. Mediators of the resolution of the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2019;40(3):212–227.
35. Perretti M, et al. Resolution pharmacology: opportunities for therapeutic innovation in inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(11):737–755.
36. Page IH, Bumpus FM. Angiotensin. *Physiol Rev*. 1961;41:331–390.
37. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958–969.
38. Sica A, et al. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology*. 2014;59(5):2034–2042.
39. Wynn TA, et al. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445–455.
40. Dalli J, Serhan CN. Pro-resolving mediators in regulating and conferring macrophage function. *Front Immunol*. 2017;8:1400.
41. Ariel A, Serhan CN. New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. *Front Immunol*. 2012;3:4.
42. Thieblemont N, et al. Regulation of macrophage activation by proteins expressed on apoptotic neutrophils: Subversion toward autoimmunity by proteinase 3. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(suppl 2):e12990.
43. Nepal S, et al. STAT6 induces expression of Gas6 in macrophages to clear apoptotic neutrophils and resolve inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(33):16513–16518.
44. Zhong X, et al. Myc-nick promotes efferocytosis through M2 macrophage polarization during resolution of inflammation. *FASEB J*. 2018;32(10):5312–5325.
45. Watanabe H, et al. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004;22(5):460–466.
46. Vago JP, et al. The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution. *J Immunol*. 2015;194(10):4940–4950.
47. Farro G, et al. CCR2-dependent monocyte-derived macrophages resolve inflammation and restore gut motility in postoperative ileus. *Gut*. 2017;66(12):2098–2109.
48. Roca H, et al. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem*. 2009;284(49):34342–34354.
49. Sierra-Filardi E, et al. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol*. 2014;192(8):3858–3867.
50. Tanaka T, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 enhances apoptotic cell removal by macrophages through Rac1 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(4):677–682.
51. Skiba DS, et al. 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):4055–4069.
52. Yang J, et al. Comparison of angiotensin-(1-7), losartan and their combination on atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*. 2015;240(2):544–549.
53. Kostenis E, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*. 2005;111(14):1806–1813.
54. Patel S, Hussain T. Dimerization of AT2 and Mas receptors in control of blood pressure. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(5):41.
55. Gaudreault E, et al. Involvement of leukotriene B4 receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005;75(1–4):25–34.
56. Gouwy M, et al. CXCR4 and CCR5 ligands cooperate in monocyte and lymphocyte migration and in inhibition of dual-tropic (R5/X4) HIV-1 infection. *Eur J Immunol*. 2011;41(4):963–973.
57. Vanbervliet B, et al. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med*. 2003;198(5):823–830.
58. Junttila MR, et al. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. 2008;22(4):954–965.
59. Lu N, Malesud CJ. Extracellular signal-regulated kinase: a regulator of cell growth, inflammation, chondrocyte and bone cell receptor-mediated gene expression. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3792.
60. Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(9):679–692.
61. Zimpelmann J, Burns KD. Angiotensin-(1-7) activates growth-stimulatory pathways in human mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(2):F337–F346.
62. Lucas M, et al. ERK activation following macrophage FcγR3 ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus.

- J Immunol.* 2005;175(1):469–477.
63. Hay M, et al. A novel angiotensin-(1-7) glycosylated Mas receptor agonist for treating vascular cognitive impairment and inflammation-related memory dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;369(1):9–25.
 64. Chen QF, et al. Lipoxin A₂ attenuates LPS-induced acute lung injury via activation of the ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis. *Innate Immun.* 2018;24(5):285–296.
 65. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5:491.
 66. Xu W, et al. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood.* 2006;107(12):4930–4937.
 67. Michlewska S, et al. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF- α . *FASEB J.* 2009;23(3):844–854.
 68. Zhao Y, et al. Thrombospondin-1 triggers macrophage IL-10 production and promotes resolution of experimental lung injury. *Mucosal Immunol.* 2014;7(2):440–448.
 69. Proto JD, et al. Regulatory T cells promote macrophage efferocytosis during inflammation resolution. *Immunity.* 2018;49(4):666–677.
 70. Soto M, et al. Improving the innate immune response in diabetes by modifying the renin angiotensin system. *Front Immunol.* 2019;10:2885.
 71. Melo EM, et al. Relevance of angiotensin-(1-7) and its receptor Mas in pneumonia caused by influenza virus and post-influenza pneumococcal infection. *Pharmacol Res.* 2021;163:105292.
 72. Tsai HJ, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates organ injury and mortality in rats with polymicrobial sepsis. *Crit Care.* 2018;22(1):269.
 73. Magalhaes GS, et al. Chronic allergic pulmonary inflammation is aggravated in angiotensin-(1-7) Mas receptor knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;311(6):L1141–L1148.
 74. Stegbauer J, et al. Mas receptor deficiency augments angiotensin II-induced atherosclerosis and aortic aneurysm ruptures in hypercholesterolemic male mice. *J Vasc Surg.* 2019;70(5):1658–1668.
 75. Ghadhanfar E, et al. The role of ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas1 receptor axis in glucocorticoid-induced intrauterine growth restriction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15(1):97.
 76. Song X, et al. 2020 White paper on recent issues in bioanalysis: vaccine assay validation, qPCR assay validation, QC for CAR-T flow cytometry, NAb assay harmonization and ELISpot validation (part 3 — recommendations on immunogenicity assay strategies, NAb assays, biosimilars and FDA/EMA immunogenicity guidance/guideline, gene & cell therapy and vaccine assays). *Bioanalysis.* 2020;13(6):415–463.
 77. Ziegler CGK, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell.* 2020;181(5):1016–1035.
 78. Henry BM, et al. Coronavirus disease 2019 is associated with low circulating plasma levels of angiotensin 1 and angiotensin 1,7. *J Med Virol.* 2021;93(2):678–680.
 79. Sullivan JC, et al. Differences in angiotensin (1-7) between men and women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308(9):H1171–H1176.
 80. Santos RA, et al. Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension.* 1992;19(2 suppl):II56–II61.
 81. Uhal BD, et al. Regulation of alveolar epithelial cell survival by the ACE-2/angiotensin 1-7/Mas axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;301(3):L269–L274.
 82. Hong L, et al. Mas receptor activation attenuates allergic airway inflammation via inhibiting JNK/CCL2-induced macrophage recruitment. *Biomed Pharmacother.* 2021;137:111365.
 83. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol.* 2010;189(7):1059–1070.
 84. Damazo AS, et al. Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *J Immunol.* 2006;176(7):4410–4418.
 85. Zhou P, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–273.
 86. Sousa LP, et al. Harnessing inflammation resolving-based therapeutic agents to treat pulmonary viral infections: what can the future offer to COVID-19? *Br J Pharmacol.* 2020;177(17):3898–3904.
 87. Verdecchia P, et al. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur J Intern Med.* 2020;76:14–20.
 88. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):355–362.
 89. Marim FM, et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One.* 2010;5(12):e15263.
 90. Machado MG, et al. The annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. *FASEB J.* 2020;34(2):2749–2764.
 91. Walther T, et al. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem.* 1998;273(19):11867–11873.