

"ECA2 uma faca de dois gumes?"

Maria Jose Campagnole-Santos*, Robson AS Santos*, Gisele S Magalhaes, Daisy Motta-Santos e Maria da Glória Rodrigues-Machado. INCT-Nanobiofarmacêutica, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais.

*Presidentes passados da SBFis; mjcampagnole-santos.ufmg@gmail.com; robsonsant@gmail.com.

A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) é a proteína/receptor pela qual o novo SARS-CoV-2, que causa a doença do vírus corona de 2019 (COVID-19), entra nas células [1,2]. Em 2003, Li e colaboradores [3] da Escola de Medicina de Harvard, EUA, já haviam descrito que uma proteína (spike proteins- domínio S1) da família do coronavírus e que causa síndrome de desconforto respiratório agudo (ARDS) se liga de forma eficiente à ECA2 [3,4]. A partir desta ligação, o envelope do vírus se funde a membrana da célula hospedeira permitindo a entrada de seu material genético e assim o vírus se replica e desencadeia doença respiratória progressiva. Uma proporção dos pacientes desenvolve ARDS, uma doença pulmonar devastadora com altas taxas de mortalidade (30-60%).

A ECA2, que está expressa em diferentes células do organismo, é uma monocarboxipeptidase que hidrolisa vários peptídeos, em especial peptídeos do sistema renina-angiotensina (SRA) [5,6]. O SRA, através das ações do eixo ECA/angiotensina (Ang) II/ receptor AT1, é um importante regulador da pressão arterial e do equilíbrio eletrolítico. No entanto, ativação inapropriada ou de longo prazo deste eixo está envolvida com a fisiopatologia de diversas doenças, entre elas as doenças inflamatórias. Hoje reconhecemos que a ECA2 é um regulador negativo deste sistema, uma vez que a ECA2 hidrolisa com alta afinidade a Ang II formando a Ang-(1-7). A Ang-(1-7) por sua vez, quando se liga ao seu receptor, o Mas, desempenha diversas ações benéficas, tais como, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, anti-proliferativas e anti-fibróticas. Constitui-se assim o eixo contraregulador do SRA: ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas [7].

A utilização da ECA2 pelo SARS-CoV-2 reduz a disponibilidade desta enzima para hidrolizar Ang II, com isso é muito provável que se estabeleça um desequilíbrio importante no SRA, com redução dos níveis de Ang-(1-7) e aumento dos níveis de Ang II, já demonstrada em animais com deleção genética da ECA2. A consequência deste desequilíbrio pode estar em grande parte relacionada com o agravamento da inflamação pulmonar e progressão da doença respiratória.

Estudos realizados em nosso [8-13] e outros (14-19) grupos de pesquisa demonstraram que o tratamento com Ang-(1-7) ou agonistas do receptor Mas ativa uma resposta anti-inflamatória em diferentes condições fisiopatológicas. Recentemente, descrevemos também que mecanismos pró-resolutivos são

desencadeados pela Ang-(1-7) em processos inflamatórios agudos e crônicos [11,12]. No pulmão, o receptor Mas é expresso no músculo liso do epitélio e das vias aéreas, células alveolares, células do músculo liso vascular e endotélio [7,9,10,20]. O receptor Mas também foi identificado nas células do sistema imunológico, como células dendríticas, linfócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos alveolares, indicando um mecanismo celular para ações da Ang-(1-7) no sistema imune [7,11,12,20].

Em modelos de inflamação pulmonar, como asma, fibrose pulmonar, ARDS e enfisema pulmonar, a administração de Ang-(1-7) diminuiu a síntese de citocinas e quimiocinas, a migração de células inflamatórias para o pulmão e melhorou a função pulmonar [7, 8-20]. Além disso, o tratamento com Ang-(1-7) melhorou a oxigenação arterial e reduziu a deposição de colágeno nos pulmões em modelos murinos de ARDS [17, 21,22]. Tais resultados sugerem que o efeito inibitório da Ang-(1-7) no recrutamento de células inflamatórias observado na fase aguda pode estar relacionado a redução da fibrose na fase posterior. É interessante ressaltar que também foram observados efeitos anti-inflamatórios após tratamentos com o inibidor da ECA, captopril e/ou antagonista de receptor AT1, losartan. Estes efeitos também podem estar relacionados ao aumento dos níveis de Ang-(1-7) no pulmão [18,19]. Em outro exemplo de inflamação pulmonar crônica, a asma, demonstrou-se que o tratamento com Ang-(1-7) reduz a contagem de eosinófilos no pulmão, reduz a produção de mediadores inflamatórios, diminui a ativação de vias de sinalização relacionadas à produção de citocinas, quimiocinas e sobrevivência de células inflamatórias [8,9]. Esses efeitos anti-inflamatórios também foram acompanhados por redução da deposição de colágeno, menor produção de muco e melhora da função pulmonar [8,9].

Uma etapa importante na resposta imune é a resolução da inflamação. A resolução é um fenômeno ativo que visa interromper a inflamação e restaurar a homeostase tecidual. Recentemente, demonstramos que Ang-(1-7) é um mediador pró-resolutivo [11,12]. Verificamos que o tratamento com Ang-(1-7) no pico da inflamação eosinofílica pulmonar induziu apoptose de eosinófilos, inibiu as vias de sinalização relacionadas à produção de citocinas e à sobrevivência das células inflamatórias e reduziu moléculas relacionadas à manutenção da resposta imune Th2 [11]. Além disso, Ang-(1-7) reduziu a expressão de genes envolvidos na expressão de colágeno no pulmão [11] em modelo murino de asma. Resultados semelhantes também foram observados em um modelo de inflamação induzida por neutrófilos, a artrite [12]. Nessa condição, o bloqueio do receptor Mas retardou a resolução natural, enfatizando que o eixo ECA2/ Ang-(1-7)/ receptor Mas desempenha um papel fisiológico importante na resolução da inflamação [12]. Resultados semelhantes foram observados em estudos de inflamação pulmonar em andamento em nosso laboratório. Além disso, em camundongos FVBN, uma linhagem resistente ao modelo de asma, a

deleção genética do receptor Mas agravou a inflamação e piorou o remodelamento pulmonar quando estes animais foram submetidos à asma experimental [10]. Portanto, além da administração terapêutica de Ang-(1-7), os resultados de nosso grupo sugerem fortemente que a ausência ou mal funcionamento da via ECA2/Ang-(1-7)/ Mas intensifica a inflamação, afeta sua resolução e contribui para a comprometimento da função do tecido inflamado.

O papel deletério da ECA2 como mediador da entrada de SARs-CoV-2 nas células pulmonares é uma questão relevante e precisa ser estudada em profundidade. Recentemente, o uso de inibidores de proteases [23] com o intuito de bloquear a ECA2, foi sugerido como terapia para o tratamento da COVID-19. No entanto, estudos já mostraram que a ausência da ECA2 (animais com deleção genética da ECA2^{-Y}) resultou em espessamento da parede alveolar, congestão e edema pulmonar, infiltração de células inflamatórias e de membrana hialina em modelo de sepse [24]. Além disso, a injeção intraperitoneal de proteína ECA2 humana recombinante (rhuACE2) em camundongos ACE2^{-Y} submetidos a modelo de ARDS [24] ou a super-expressão de ECA2 [25] impediu o aumento da elastância do sistema respiratório e edema pulmonar [24] e melhorou a histopatologia pulmonar, diminuiu neutrófilos e mediadores inflamatórios pulmonares, reduziu a Ang II e aumentou os níveis pulmonares da Ang-(1-7) [25,26].

Na COVID-19, o eixo do SRA com papel anti-inflamatório e pró-resolutivo está prejudicado pela ligação de SARs-CoV-2 à ACE2. Assim, estratégias terapêuticas que visem apenas a inibição da ACE2 precisam ser avaliadas com cautela. Ativação do receptor Mas por Ang-(1-7) ou seus análogos isoladamente ou em combinação com a administração de ECA2 solúvel recombinante que se liga à proteína spike do vírus e deixa a ECA2-ligada a membrana celular disponível [27], podem ser importantes medidas aditivas para controlar a resposta inflamatória mediada por SARS-CoV-2 no pulmão.

1. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, Bi Y, Ma X, Zhan F, Wang L, Hu T, Zhou H, Hu Z, Zhou W, Zhao L, Chen J, Meng Y, Wang J, Lin Y, Yuan J, Xie Z, Ma J, Liu WJ, Wang D, Xu W, Holmes EC, Gao GF, Wu G, Chen W, Shi W, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565–574, 2020.
2. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, and Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181: 1-10, 2020.
3. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M.

- Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426: 450-454, 2003.
4. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, and Penninger JM. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* 11: 875-879, 2005
 5. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;7(5):E1-E9.
 6. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme cloning and functional expression. As a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33238-33243
 7. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, and Campagnole-Santos MJ. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the renin-angiotensin system: Focus on angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* 98: 505-553, 2018.
 8. Rodrigues-Machado MG, Magalhães GS, Cardoso JA, Kangussu LM, Murari A, Caliari MV, Oliveira ML, Cara DC, Noviello MLM, Marques FD, Pereira JM, Lautner RQ, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ. AVE 0991, a non-peptide mimic of angiotensin-(1-7) effects, attenuates pulmonary remodelling in a model of chronic asthma. *Brit J Pharmacol* 170: 835-846, 2013.
 9. Magalhaes GS, Rodrigues-Machado MG, Motta-Santos D, Silva AR, Caliari MV, Prata LO, Abreu SC, Rocco PR, Barcelos LS, Santos RA, and Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *Br J Pharmacol* 172: 2330-2342, 2015
 10. Magalhaes GS, Rodrigues-Machado MG, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, Santos RA, Barcelos LS, and Campagnole-Santos MJ. Chronic allergic pulmonary inflammation is aggravated in angiotensin-(1-7) Mas receptor knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311: L1141-L1148, 2016.
 11. Magalhaes GS, Barroso LC, Reis AC, Rodrigues-Machado MG, Gregório JF, Motta-Santos D, Oliveira AC, Perez DA, Barcelos LS, Teixeira MM, Santos RAS, Pinho V, and Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) promotes resolution of eosinophilic inflammation in an experimental model of asthma. *Front Immunol* 9: 58, 2018.
 12. Barroso LC, Magalhaes GS, Galvão I, Reis AC, Souza DG, Sousa LP, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Pinho V and Teixeira MM. Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Front Immunol* 8: 1596, 2017.
 13. Bastos AC, Magalhães GS, Gregório JF, Matos NA, Motta-Santos D, Bezerra FS, Santos RAS, Campagnole Santos MJ, and Rodrigues-Machado MG. Oral formulation angiotensin-(1-7) therapy attenuates pulmonary and systemic damage in mice with emphysema induced by elastase. *Immunobiology* 1593, 2019.
 14. El-Hashim AZ, Renno WM, Raghupathy R, Abduo HT, Akhtar S, Benter IF. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the Mas receptor, through suppression of ERK1/2 and NFκB-dependent pathways. *Br J Pharmacol* 166: 1964-1976, 2012.

15. Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Díez-Freire C, Dooies A, Jun JY, Sriramula S, Mariappan N, Pourang D, Venugopal CS, Francis J, Reudelhuber T, Santos RA, Patel JM, Raizada MK, and Katovich MJ. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 1065-1072, 2010.
16. Wösten-van Asperen RM, Lutter R, Specht PA, Moll GN, van Woensel JB, van der Loos CM, van Goor H, Kamilic J, Florquin S, and Bos AP. Acute respiratory distress syndrome leads to reduced ratio of ACE/ACE2 activities and is prevented by angiotensin-(1-7) or an angiotensin II receptor antagonist. *J Pathol* 225: 618-627, 2011.
17. Zambelli V, Bellani G, Borsa R, Pozzi F, Grassi A, Scanziani M, Castiglioni V, Masson S, Decio A, Laffey JG, Latini R, and Pesenti A. Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Intensive Care Med Exp* 3: 44, 2015
18. Jerng JS, Hsu YC, Wu HD, Pan HZ, Wang HC, Shun CT, Yu CJ, and Yang PC. Role of the renin-angiotensin system in ventilator-induced lung injury: an in vivo study in a rat model. *Thorax* 62: 527-535, 2007.
19. Jiang JS, Wang LF, Chou HC, and Chen CM. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril attenuates ventilator-induced lung injury in rats. *J Appl Physiol* (1985) 102: 2098-2103, 2007.
20. Rodrigues Prestes TR, Rocha NP, Miranda AS, Teixeira AL and Simoes-E-Silva AC. The anti-inflammatory potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis: evidence from basic and clinical research. *Curr Drug Targets* 18(11): 1301-1313, 2017.
21. Chen Q, Yang Y, Huang Y, Pan C, Liu L, Qiu H. Angiotensin-(1-7) attenuates lung fibrosis by way of Mas receptor in acute lung injury. *J Surg Res.* 185:740-747, 2013
22. Klein N, Gembardt F, Supé S, Kaestle SM, Nickles H, Erfinanda L, Lei X, Yin J, Wang L, Mertens M, Szaszi K, Walther T, Kuebler WM. Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med.* 41(11):e334-43, 2013.
23. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, and Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181: 1-10, 2020.
24. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* 436(7047): 112-116, 2005.
25. He H, Liu L, Chen Q, Liu A, Cai S, Yang Y, Lu X, and Qiu H. Mesenchymal stem cells overexpressing angiotensin-converting enzyme 2 rescue lipopolysaccharide-induced lung injury. *Cell Transplant* 24(9): 1699-1715, 2015.
26. Li Y, Zeng Z, Cao Y, Liu Y, Ping F, Liang M, Xue Y, Xi C, Zhou M, and Jiang W. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF- κ B signaling pathways. *Sci Rep* 6: 27911, 2016.

27. Batlle D, Wysocki J, Satchell K. Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy?. *Clin Sci* 134: 543–545, 2020.