UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

INFLUÊNCIA DA ANEXINA A1 SOBRE A FAGOCITOSE E A EXPRESSÃO DE
RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA EM
CÉLULAS DA MICROGLIA

Gustavo Henrique Oliveira da Rocha

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo, 2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

INFLUÊNCIA DA ANEXINA A1 SOBRE A FAGOCITOSE E A EXPRESSÃO DE
RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA EM
CÉLULAS DA MICROGLIA

Gustavo Henrique Oliveira da Rocha

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo, 2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

R672i Rocha, Gustavo Henrique Oliveira da
Influência da anexina A1 sobre a fagocitose e a expressão de
receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama em
células da microglia / Gustavo Henrique Oliveira da Rocha. --
São Paulo, 2017.
93p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Imunologia 2. Inflamação I. T. II. Farsky, Sandra Helena
Poliselli, orientador.

615.37 CDD

Gustavo Henrique Oliveira da Rocha

INFLUÊNCIA DA ANEXINA A1 SOBRE A FAGOCITOSE E A EXPRESSÃO DE
RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA EM
CÉLULAS DA MICROGLIA

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr.
Sandra Helena Poliselli Farsky
orientador/presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017

AGRADECIMENTOS

Recordo-me ainda como se fosse ontem o dia em que pisei em solo paulistano pela primeira vez, o dia em que conheci o laboratório onde trabalharia por dois anos a fio, o dia em que realizei a matrícula e ingressei em um programa de mestrado. Tinha certeza que seria uma longa jornada, mas não imaginava que um dia chegaria ao seu término.

E em que tal jornada me acrescentou? Conhecimento, científico e “para a vida”, antes de tudo, bem como amadurecimento. Muitos dizem que tal jornada costuma ser árdua e que o esforço por vezes não vale a pena. Eu, contudo, faria tudo novamente, sem arrependimentos. Dizem que a defesa do mestrado é uma jornada que se encerra; eu vejo na verdade como apenas uma etapa concluída ainda no início de uma outra longa jornada dentro da ciência. A ciência, na verdade, por si só é uma jornada que pretendo trilhar por ainda muito tempo.

Devo meus agradecimentos iniciais à minha orientadora, quem me abriu as portas de seu laboratório e me permitiu iniciar minha caminhada pela ciência. Devo muito do meu amadurecimento científico a ela.

Outros professores e colaboradores também têm meus agradecimentos, seja devido ao auxílio direto com protocolos experimentais, seja devido à partilha de conhecimento teórico. Todos foram essenciais para a realização deste trabalho.

Em seguida, deixo meus agradecimentos a todos as pessoas que passaram pela minha vida neste período de dois anos em que conduzi o mestrado. Colegas de laboratório ou amigos externos, seja pelo auxílio no local de trabalho ou, simplesmente, sendo companheiros em demais momentos, todos me acrescentaram algo e me acompanharam neste período. Não citarei nomes, eles sabem quem são.

Finalmente, mas não menos importante, dedico minha maior gratidão aos meus pais. Se hoje sou um indivíduo maduro e com caráter, que valoriza o trabalho, foi devido ao exemplo e à educação obtida dos meus pais. Ambos são modelos que sigo e utilizo para me espelhar na tentativa de ser um ser humano melhor. Jamais chegaria a qualquer lugar não fosse o privilégio de tê-los tido como ideais a aspirar.

RESUMO

ROCHA, G. H. O. **Influência da anexina A1 sobre a fagocitose e a expressão de receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama em células da microglia.** 2017. 93f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A inflamação é fundamental para a manutenção da homeostasia e para a resposta do organismo à injúria. A resposta inflamatória deve ser adequada aos estímulos agressores; no sistema nervoso central, sua inadequação conduz à gênese de diferentes doenças neurodegenerativas. A proteína anexina A1 (ANXA1) e os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR) controlam a inflamação, pois ambos inibem o desenvolvimento da inflamação e aceleram sua resolução. Nosso grupo de pesquisa tem mostrado que a ANXA1 modula a expressão de PPAR γ em macrófagos. Assim, o presente trabalho investigou a modulação da expressão do PPAR γ e das suas funções em células da microglia pela ANXA1. Foram empregadas células imortalizadas da linhagem BV2 (microglia murina), inalteradas ou transfectadas para redução da expressão de ANXA1, tratadas com ANXA1 exógena (recombinante – rANXA1) ou com agonista ou antagonista de PPAR γ (pioglitazona e GW9662, respectivamente). Os resultados obtidos mostraram que: 1) tratamento com rANXA1 aumenta as expressões gênica (RT-PCR) e proteica (*Western Blotting*) de PPAR γ , e ambas as expressões estão reduzidas em células com deficiência endógena de ANXA1, sendo que tal efeito foi revertido pela ação da rANXA1; 2) tratamento com rANXA1 não induz a expressão dos fatores de transcrição ligados a expressão de PPAR γ : proteínas ligantes de elementos de resposta ao cAMP – CREB – e transdutores de sinais e ativadores de transcrição – STAT6 – (*Western Blotting*), mas os níveis de ambos os fatores estão reduzidos em células transfectadas, e tal efeito não foi revertido pelo tratamento com rANXA1; 3) tratamento com pioglitazona ou com rANXA1 individualmente aumenta a fagocitose de células PC12 apoptóticas (citometria de fluxo), mas o tratamento simultâneo não altera a fagocitose induzida por pioglitazona ou rANXA1; no entanto, tratamento com GW9662 inibiu a fagocitose induzida pelo

tratamento com rANXA1; 4) o tratamento com rANXA1 aumenta a expressão de CD36 (citometria de fluxo); a expressão de CD36 está reduzida em células transfectadas e tal expressão não é revertida pelo tratamento com rANXA1. Em conjunto, os dados obtidos mostram a modulação da ANXA1 sobre PPAR γ em células da micróglia, com possível ação sobre a fagocitose de células apoptóticas, e que a redução da expressão de ANXA1 reduz acentuadamente a expressão dos fatores de transcrição STAT6 e CREB, bem como a expressão de CD36. A elucidação dos efeitos resultantes destas alterações desencadeadas pela deficiência de ANXA1 endógena poderá contribuir para compreensão da fisiopatologia da neuroinflamação.

Palavras-chave: anexina A1, PPAR γ , CREB, STAT6, fagocitose, CD36, resolução da inflamação, neurodegeneração.

ABSTRACT

ROCHA, G. H. O. **Influence of annexin A1 upon phagocytosis and expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma in microglial cells.** 2017. 93f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Inflammation is a key process in maintaining homeostasis and is essential for the body's response to injury. The inflammatory response must be proportional to the aggressor stimuli; in the central nervous system, a failed proper modulation leads to the development of different neurodegenerative diseases. Protein annexin A1 (ANXA1) and peroxisome proliferated-activated receptors (PPAR) control inflammation, as both inhibit development of inflammation and accelerate its resolution. Our research group has demonstrated that ANXA1 modulates PPAR γ expression in macrophages. Thus, the present work investigated the modulation of PPAR γ expression and its functions in microglia cells by ANXA1. In order to assess such, immortalized cells from cell line BV2 (murine microglia), either unadulterated or transfected for reduced expression of ANXA1, were treated with exogenous ANXA1 (recombinant protein – rANXA1) or either with PPAR γ agonist or antagonist (pioglitazone and GW9662, respectively). The obtained results demonstrated that: 1) treatment with rANXA1 increases both gene (RT-PCR) and protein (*Western Blotting*) expressions of PPAR γ , and also that both expressions are reduced in cells with endogenous deficiency of ANXA1, and such effect was reversed by the actions of rANXA1; 2) treatment with rANXA1 does not promote the expression of transcription factors associated with PPAR γ expression: cAMP response element binding protein – CREB – and signal transducer and activator of transcription 6 – STAT6 (*Western Blotting*), but the expression levels of both factors are reduced in transfected cells, and such effect was not reversed by treatment with rANXA1; 3) individual treatment with pioglitazone or rANXA1 increases phagocytosis of apoptotic PC12 cells (flow cytometry), but simultaneous treatment does not affect pioglitazone/rANXA1-induced phagocytosis; however, treatment with GW9662 inhibited rANXA1-induced phagocytosis; 4) treatment with rANXA1 increases CD36 expression

(flow cytometry); the expression of CD36 is reduced in transfected cells, and such expression is not reversed by treatment with rANXA1. The obtained data demonstrate the modulation ANXA1 exerts upon PPAR γ in microglia cells, with a possible action upon phagocytosis of apoptotic cells, and that reduction of ANXA1 expression greatly reduces the expression of transcription factors STAT6 and CREB, as well as the expression of CD36. Elucidation of such effects that arise from a deficiency of endogenous ANXA1 will contribute to a better comprehension of the pathophysiology of neuroinflammation.

Key-words: annexin A1, PPAR γ , CREB, STAT6, phagocytosis, CD36, resolution of inflammation, neurodegeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resolução da inflamação	20
Figura 2 - Ações da ANXA1 no controle e resolução da inflamação	25
Figura 3 - Mecanismos transcricionais decorrentes da ativação de PPAR γ e consequentes efeitos anti-inflamatórios	32
Figura 4 - Expressão proteica de PPAR γ por células BV2 após tratamento com rANXA1	46
Figura 5 - Expressão proteica de PPAR γ por células BV2 após tratamento com rANXA1 e pioglitazona	47
Figura 6 - Expressão proteica de ANXA1 por células BV2 transfectadas	48
Figura 7 - Expressão proteica de PPAR γ por células BV2 transfectadas após tratamento com rANXA1	49
Figura 8 - RT-PCR por análise de <i>melt curve</i>	50
Figura 9 - Expressão gênica de PPAR γ por células BV2 após tratamento com rANXA1	50
Figura 10 - Expressão gênica de PPAR γ por células BV2 transfectadas após tratamento com rANXA1	51
Figura 11 - Expressão proteica de STAT6 por células BV2 transfectadas e não- transfectadas após tratamento com rANXA1	52
Figura 12 - Expressão proteica de CREB por células BV2 transfectadas e não- transfectadas após tratamento com rANXA1	53
Figura 13 - Determinação de viabilidade de células PC12 mediante deprivação de soro por 24 h	54

Figura 14 - Determinação de viabilidade de células PC12 mediante deprivação de soro por 48 h	55
Figura 15 - Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 em diferentes tempos	56
Figura 16 - Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 após tratamento com rANXA1	56
Figura 17 - Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 após tratamento com rANXA1 e pioglitazona	57
Figura 18 - Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 após tratamento com rANXA1 e GW9662	58
Figura 19 - Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 transfectadas após tratamento com rANXA1 e GW9662	59
Figura 20 - Determinação da expressão de CD36 por células BV2 após tratamento com rANXA1	60
Figura 21 - Determinação da expressão de CD36 por células BV2 após tratamento com rANXA1 e realização de fagocitose	61

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
ANXA1	Anexina A1
APC	<i>Allophycocyanin</i>
CD14	<i>Cluster</i> de diferenciação 14
CD36	<i>Cluster</i> de diferenciação 36
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
cDNA	DNA complementar
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil-éster
CO2	Gás carbônico
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ERK	<i>Extra-cellular regulated kinase</i>
FPR	<i>Formyl peptide receptor</i>
FPR2	<i>Formyl peptide receptor 2</i>
HCL	Ácido clorídrico
ICAM-1	<i>Intracellular cell adhesion molecule-1</i>
IgE	Imunoglobulina E

IκB-α	<i>Nuclear factor kappa polypeptide gene enhancer B cells inhibitor</i>
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-6R	Receptor de interleucina 6
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP4K4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4</i>
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MAPK3	<i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>
MFG-8E	<i>Milk fat globule epidermal growth factor 8</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NaCl2	Cloreto de sódio
NF-κB	<i>Nuclear transcription factor κ B</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>

PBS	<i>Phosphate buffer saline (solução salina 0,9%)</i>
PMSF	<i>Metilfenilsulfonilflúor</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator receptor</i>
PPARα	<i>Peroxisome proliferator receptor α</i>
PPARδ/β	<i>Peroxisome proliferator receptor δ/β</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator receptor γ</i>
PPRE	<i>Peroxisome proliferator response element</i>
p-CREB	<i>CREB fosforilada</i>
p-STAT6	<i>STAT6 fosforilada</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
RPMI 1640	<i>Roswel Park Memorial Institute 1640 (meio de cultura)</i>
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
SDS/PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate / polyacrylamide gel electroforesis</i>
SNC	<i>Sistema nervoso central</i>
STAT6	<i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffer saline-Tween</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis fator α</i>

WB

Western Blotting

$\Delta\Delta\text{Ct}$

$\Delta\Delta$ cycle threshold

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Inflamação e fagocitose	19
1.2. ANXA1, modulação da inflamação e fagocitose	22
1.3. ANXA1 e microglia	26
1.4. PPAR γ , modulação endógena da inflamação e fagocitose	29
1.5. PPAR γ e micróglia	34
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	37
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
5. MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1. Cultura e manutenção de células	37
5.2. Indução de células PC12 à apoptose	38
5.3. Transfecção de células BV2	39
5.4. Tratamento de células BV2	40
5.5. <i>Western blotting</i> (WB)	41
5.6. <i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)	42
5.7. Fagocitose de células PC12 por células BV2	44
5.8. Expressão de CD36 por células BV2	45
5.9. Análise estatística	45
6. RESULTADOS	45

6.1. Efeito da ANXA1 exógena e endógena sobre a expressão proteica de PPAR γ	45
6.2. Efeito da ANXA1 exógena e endógena sobre a expressão gênica de PPAR γ	49
6.3. Vias de transcrição envolvidas com controle da ANXA1 sobre a expressão de PPAR γ	51
6.4. Efeitos da interação ANXA1/PPAR γ sobre a fagocitose de células apoptóticas	53
6.5. Efeitos da interação ANXA1/PPAR γ sobre a expressão de CD36	59
7. DISCUSSÃO	61
8. CONCLUSÕES	71
9. REFERÊNCIAS	71
10. ANEXOS	82
10.1. Informações para os membros da Banca Julgadora de Mestrado	82
10.2. Estratégia de <i>gating</i> para determinação de viabilidade celular	84
10.3. Estratégia de <i>gating</i> para determinação de fagocitose	84
10.4. Membrana representativa de <i>Western Blotting</i> para ANXA1	85
10.5. Membrana representativa de <i>Western Blotting</i> para PPAR γ	85
10.6. Membrana representativa de <i>Western Blotting</i> para STAT6	86
10.7. Membrana representativa de <i>Western Blotting</i> para CREB	86
10.8. Representação gráfica da intensidade de fluorescência para CD36	87
10.9. Currículo Lattes	87

10.10. Ficha do aluno	93
-----------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação e fagocitose

A inflamação, seja aguda ou crônica, é um processo natural desencadeado pelo organismo em resposta a condições de estresse e injúria tissular. A inflamação decorre de uma série de alterações fisiológicas que envolvem, de maneira geral, mudanças no fluxo de células, na reatividade e permeabilidade vasculares e na síntese e liberação de mediadores inflamatórios por uma diversidade de células envolvidas em tal processo. Ademais, as células envolvidas com a inflamação realizam fenômenos microbicidas, humorais e de fagocitose (RYAN & MAJNO, 1977).

Tradicionalmente vista como um processo reativo mediante dano tissular, a inflamação e seus mecanismos adjuvantes são considerados, atualmente, fatores ativos importantes para a manutenção homeostática do organismo. Citocinas e quimiocinas, costumeiramente associadas ao desenvolvimento de processos inflamatórios, são também secretadas em condições de homeostase, estimulando células indiferenciadas, manutenção tecidual e regulação de proliferação celular, além de serem expressas em maiores quantidades mediante estímulos nocivos (ANDERS et al., 2014; CARDONA et al., 2013). Receptores *toll-like*, responsáveis por iniciar respostas inflamatórias mediante reconhecimento de produtos microbianos, são também capazes de reconhecer produtos normais da dieta, como ácidos graxos, ativando mecanismos tradicionalmente inflamatórios, mesmo em condições fisiológicas normais (MIYAKE & KAISHO, 2014). O fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF-kB), responsável pela transcrição de proteínas mediadoras da inflamação, desempenha papéis fisiológicos na manutenção de células epiteliais, e é expresso de maneira constitutiva sem acarretar injúria inflamatória (GUMA et al., 2011). Em condições associadas a doenças de caráter crônico, como a obesidade, onde a inflamação é sabidamente envolvida, ainda que em baixa intensidade, o processo inflamatório ocorre inicialmente para fins de remodelamento tecidual e manutenção de adipócitos, e só com o tempo progride como estímulo nocivo (ITOH et al., 2011). Assim, a manutenção da homeostase envolve vários fatores “pró-inflamatórios” que não necessariamente

promovem inflamação em condições não exacerbadas, mas que podem suplantar o controle homeostático do organismo. Isso, contudo, não ocorre de forma arbitrária e requer desregulações mais acentuadas da homeostasia do organismo (KOTAS & MEDZHITOV, 2015).

Ainda que fundamental à defesa do organismo frente a estímulos nocivos e também para manutenção da homeostase, a secreção de enzimas lisossomais e o estresse oxidativo induzidos durante a atividade fagocítica e microbicida, dentre outros fatores, podem provocar danos ao tecido inflamado caso o processo inflamatório se estenda exacerbadamente. Diversos mecanismos celulares fazem com que a resposta inflamatória retroceda logo que a causa da injúria original é eliminada, em um processo conhecido como resolução da inflamação (KUMAR et al., 2005).

Fig. 1. Resolução da inflamação (adaptado de Serhan et al., 2007). A imagem A esquematiza o processo inflamatório seguindo seu curso normal. Mediante injúria ou infecção, diversos fatores são ativados e polimorfonucleares são recrutados, desencadeando a inflamação. Após "pico" do processo inflamatório, fatores como lipoxinas, prostaglandina J₂ e TGFβ₁, entre outros, promovem *clearance* de neutrófilos apoptóticos, retornando o tecido a condições fisiológicas normais pré-injúria/infecção. A imagem B mostra os mesmos eventos vistos na inflamação aguda, mas devido à falha da ação de fatores anti-inflamatórios endógenos, o tecido inflamado torna-se incapaz de resolver a inflamação, desencadeando processos inflamatórios crônicos que tendem a causar danos ao tecido afetado.

Durante a inflamação, ocorre um elevado influxo de neutrófilos para o tecido injuriado, indispensáveis nas etapas iniciais da resposta inflamatória. Tais neutrófilos têm a função de realizar a fagocitose de possíveis fatores exógenos, modular outros processos quimiotáticos que ampliam ainda mais a resposta inflamatória ao atrair monócitos e células dendríticas para o local de inflamação, recrutar linfócitos T e promover, em alguma extensão, a diferenciação destas células. Os neutrófilos ainda possuem a propriedade de secretar citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL) 1 (IL-1), IL-8 e o fator de necrose tumoral α (TNF α), entre outras; de secretar eicosanoides e produzir óxido nítrico (NO); de liberar conteúdos de grânulos intracelulares, e até mesmo apresentar antígenos pela expressão de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe I e classe II e outras proteínas de membrana (AMULIC et al., 2012; WRIGHT et al., 2010).

Nas etapas finais da inflamação, os neutrófilos se tornam senescentes e entram em apoptose, requerendo sua remoção antes que entrem em necrose. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos é um dos principais mecanismos envolvidos com a resolução da inflamação. É importante mencionar, contudo, que tal processo de remoção de células senescentes também ocorre em condições não-inflamatórias, e a remoção não só de neutrófilos senescentes, mas também de outros tipos celulares envelhecidos, como eritrócitos e neurônios, ocorre em condições homeostáticas normais simplesmente para que o *turnover* destas células se mantenha em níveis apropriados; além disso, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, mesmo que funcionais, podem ser fagocitados desta forma sem desencadear uma resposta inflamatória, limitando o tempo que fagócitos permanecem ativados. Tal processo de fagocitose “homeostática” é chamada por alguns autores de *fagoptose* (BROWN et al., 2015; SAVILL et al., 1989; SILVA, 2011). O processo de senescência de neutrófilos migrantes é mediado por fatores inflamatórios, como lipopolissacarídeos (LPS), bem como por fatores ambientais, como a hipóxia; ao mesmo tempo, fatores apoptóticos, como Bac, Bax e caspases, são ativados. Vários destes fatores inflamatórios são reconhecidos por macrófagos, que neste momento se diferenciam de fenótipo M1 inflamatório para M2 anti-inflamatório, e estes realizam a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos. Neutrófilos a serem fagocitados também expressam sinais de atração

(conhecidos como “*find me*”) e de fagocitose *per se* (conhecidos como “*eat me*”); fatores de atração incluem lisofosfatidilcolina, trombospondina 1 e o receptor de IL-6 (IL-6R), e o principal processo que induz a fagocitose propriamente dita é a externalização de serina fosforilada por neutrófilos. Ainda, alguns fatores, como, por exemplo, o *milk fat globule epidermal growth factor 8* (MFG-8E), atraem os neutrófilos até os macrófagos, e não o contrário, o que evidencia que o processo quimiotático entre neutrófilos e macrófagos funciona de forma recíproca (SILVA, 2011). A fagocitose de neutrófilos apoptóticos promovida por macrófagos M2 resulta na liberação de fatores anti-inflamatórios, como IL-10 e *transforming growth factor* β (TGF- β), e também promove supressão da liberação de fatores pró-inflamatórios. Falhas na fagocitose de neutrófilos apoptóticos resultam em processo necrótico e continuação da inflamação, com consequente dano tecidual (AMULIC et al., 2012; FADOK et al., 1998). Após a resolução da inflamação, existe ainda uma série de eventos celulares pós-inflamatórios, onde macrófagos residentes e macrófagos que migram aos linfonodos nos períodos iniciais da inflamação se associam a outros leucócitos migrantes, especialmente linfócitos, para promoção do processamento antigênico; após a resolução do período inflamatório, macrófagos ainda permanecem atuantes, estabelecendo uma transição entre a resposta inata e a resposta humoral (FULLERTON & GILROY, 2016).

Do exposto, é evidente que a inflamação é um processo endógeno, que deve estar pronto para ser desencadeado quando necessário, mas que não deve ser exacerbado. Neste caso, mecanismos de morte celular e que modificam o fenótipo de células inflamatórias para anti-inflamatórias, responsáveis pela resolução do processo inflamatório, são ativados.

1.2. ANXA1, modulação da inflamação e fagocitose

As anexinas compõem uma superfamília de proteínas capazes de realizar ligações com fosfolipídios mediante presença de cálcio, mantendo em comum um núcleo principal contendo 4 motivos de 70 aminoácidos cada, responsáveis pela ligação com o cálcio. A anexina A1 (ANXA1), uma proteína de 37 kDa composta de 346 aminoácidos, apresenta um grupamento N-terminal de 49 aminoácidos que a difere das

demaís anexinas, e é justamente este N-terminal o responsável pela fosforilação e proteólise da ANXA1, que medeiam sua regulação. A ANXA1 é encontrada em diferentes locais conforme o tipo celular e conforme o estágio de atividade da célula em questão; em neutrófilos e mastócitos, se encontra em grânulos, enquanto em macrófagos está presente em maiores quantidades no citoplasma (D'ACQUISTO et al., 2008; LIM & PERVAIZ, 2007).

Diversas funções da ANXA1 foram descritas na literatura científica, como suas propriedades em inibir a enzima fosfolipase A2, modular o processo inflamatório e controlar a apoptose celular. A modulação da expressão de ANXA1 por glicocorticoides foi evidenciada por vários autores, que mostraram que a ANXA1 é uma proteína responsável pelos efeitos anti-inflamatórios desta classe de hormônios esteroidais (LIM & PERVAIZ, 2007; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009; SAWMYNADEN & PERRETTI, 2006).

Como mencionado, a ANXA1 é uma proteína responsável pela modulação do processo inflamatório, especialmente envolvida com o desenvolvimento da resposta imune inata e com a resolução de tal processo. Diversos modelos experimentais demonstraram tal propriedade em inúmeros tecidos, como os tecidos gastrintestinais, nervosos e respiratórios (BABBIN et al., 2008; BENSALÉM et al., 2005; MCARTHUR et al., 2010). Sabe-se que a ANXA1, tanto endógena como exógena, inibe a interação inicial dos leucócitos circulantes com o endotélio de microvasos ao induzir a clivagem da molécula de adesão L-selectina em leucócitos, especialmente em neutrófilos; induz a apoptose de neutrófilos, funcionando como um sinal “*eat-me*” em neutrófilos apoptóticos; e estimula a fagocitose realizada por macrófagos (HEADLAND & NORLING, 2015). Todos estes eventos convergem tanto para prevenção de danos inflamatórios como para resolução do processo inflamatório propriamente dito. Por exemplo, em modelos murinos de doença de Alzheimer, foi demonstrado que a ANXA1 mobiliza fagócitos para remoção de peptídeos β -amilóides reduzindo a intensidade da doença, evidenciando que a ANXA1 exerce seus efeitos anti-inflamatórios mesmo em processos cronificados. Em camundongos *knockout* para ANXA1 submetidos à infarto por oclusão da artéria coronária, verifica-se uma migração reduzida de células hematopoiéticas pluripotentes para o coração infartado, sugerindo que a ANXA1

modula também a migração e a diferenciação celular após resolução de efeitos inflamatórios (QIN et al., 2016; RIES et al., 2016).

Vários eventos e mecanismos moleculares estão relacionados com a resolução da inflamação desencadeada pela ANXA1. Quando secretada ao exterior celular, a ANXA1 interage, de forma autócrina ou parácrina, com receptores FPR (receptores de peptídeos formilados) acoplados a proteínas G na superfície celular de macrófagos, neutrófilos, monócitos e células endoteliais, gerando uma série de eventos intracelulares, nominalmente a fosforilação de cinases chamadas *mitogen-activated protein kinase* 1 e 3 (MAPK1 e MAPK3), que culminam com a redução da migração leucocitária; além disso, a própria ANXA1 modula a expressão destas proteínas (BABBIN et al., 2008; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009). Outros eventos intracelulares incluem a fosforilação de outros fatores de transcrição associados com a inibição de efeitos pró-inflamatórios, como STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*) (PUPJALLIS et al., 2011) e CREB (*cAMP response element binding protein*), que também é um fator ativado mediante fosforilação de MAPKs pela ANXA1 (CALDAS et al., 2003). Tais fatores, uma vez ativados, medeiam os efeitos anti-inflamatórios promovidos pela ANXA1, como a redução da produção de IL-6 (CALDAS et al., 2003; PUPJALLIS et al., 2011). A expressão de ANXA1 por macrófagos responsáveis pela fagocitose de células em necrose secundária (que por sua vez também externalizam ANXA1) atenua a síntese das mesmas citocinas pró-inflamatórias mencionadas acima, especialmente TNF α (BLUME et al., 2009). A ANXA1 se liga ao fator de transcrição NF- κ B, formando um dímero incapaz de se ligar ao DNA e, portanto, ineficaz em gerar as atividades inflamatórias naturais do NF- κ B, o que mostra que mesmo que processos pró-inflamatórios já estejam em curso, a ANXA1 é também eficiente em neutralizá-los (ZHANG et al., 2010). A síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, é possivelmente também dependente da interação da ANXA1 com MAPKs, uma vez que estudos demonstram que a ativação das vias de MAPK que convergem para a liberação de citocinas é exacerbada em animais deficientes de ANXA1 (YANG et al., 2006).

Fig. 2. Ações da ANXA1 no controle e resolução da inflamação (adaptado de Lim e Pervaiz, 2007 e de Scannell e Maderna, 2006). A imagem A esquematiza algumas das funções anti-inflamatórias da ANXA1, que incluem: inibição da atividade das enzimas fosfolipase A2 e ciclo-oxigenase 2; inibição de adesão e migração celular, especialmente de neutrófilos; mediação da fagocitose de células apoptóticas via ligação com fosfatidilserina; indução de apoptose via BAD e BCL2; controle de proliferação celular após ser fosforilada. A imagem B demonstra um dos eventos celulares promovidos pela ANXA1 em macrófagos; a ANXA1, ao interagir com o receptor FPR em macrófagos, causa rearranjo de filamentos de actina que possibilitam ao macrófago assim “ativado” fagocitar células apoptóticas, etapa fundamental para resolução do processo inflamatório.

ANXA1, quer seja endógena ou exógena, se liga à superfície de células apoptóticas, em especial a resíduos de serina fosforilada, e funciona como um sinal quimiotático (“eat-me”) para macrófagos realizarem fagocitose. Ainda que a proteína

como um todo seja responsável pela atividade indutora de fagocitose, fragmentos do N-terminal proteico são também capazes de induzir fagocitose, mesmo que em menor extensão quando se compara com a proteína íntegra (BLUME et al., 2009; DALLI et al., 2012; LIM & PERVAIZ, 2007; VAGO et al., 2012). Nota-se que tal expressão de ANXA1 é prevalente apenas durante a apoptose celular e durante estágios iniciais de necrose, induzindo estes processos para fins de aumento da atividade fagocítica de macrófagos; células viáveis ou em estágio tardio de necrose pouco expressam ANXA1 (BLUME et al., 2009). Ainda, diferentes tipos celulares expressam ANXA1 durante estágios apoptóticos, como neutrófilos e linfócitos T; também o fazem células não necessariamente ligadas à imunidade, como ocorre com células mesangiais localizadas nos rins (SCANNELL et al., 2007). ANXA1 não só atua como sinal quimiotático para macrófagos realizarem fagocitose de células apoptóticas, mas também atua no processo de fagocitose propriamente dito facilitando-o; estudos demonstram que a ANXA1 é fundamental para facilitar a ligação de filamentos de actina a fagossomos no interior de macrófagos, por meio de interações dependentes de cálcio intracelular e fosfolipídios de membrana (PATEL et al., 2010).

Em conjunto, as informações aqui apresentadas são resultantes da compilação de trabalhos que mostram que a ANXA1 é uma proteína com papel fundamental na resposta inflamatória, que atua tanto no sentido de limitar o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda como para promoção de sua resolução. Muitos mecanismos descrevem suas ações na inflamação, mediados na grande maioria pelo FPR2, mas estes não são ainda completamente elucidados.

1.3. ANXA1 e microglia

Microglia é o nome dado ao conjunto de células de origem monocítica residentes no sistema nervoso central (SNC), e compõe aproximadamente 12% de todas as células cerebrais. Uma vez que as células microgliais são oriundas de linhagens mielóides, são responsáveis pela imunidade inata no cérebro e na medula espinhal, respondendo à injúria ou a qualquer outro tipo de estímulo inflamatório. Uma vez que estes estímulos sejam reconhecidos pela microglia, esta passa a expressar

moléculas de superfície, como CD-14 e MHCs, e a secretar mediadores, como citocinas, NO e proteases, que medeiam o desencadeamento da resposta imune. As células da microglia ainda são responsáveis indiretamente pela homeostasia de neurônios, controlando a apoptose e a regeneração destes, bem como a fagocitose de neurônios apoptóticos (BLOCK, et al., 2007; GLEZER et al., 2007). Assim como ocorre nos sistemas orgânicos periféricos, processos inflamatórios no SNC, ainda que benéficos, devem ser modulados para que se evitem danos. A modulação da resposta imune no SNC depende de várias citocinas anti-inflamatórias liberadas pela própria microglia, como IL-10 e TGF- β , e também da liberação de glicocorticoides endógenos (GLEZER et al., 2007; KREUTZBERG, 1996). Falha na modulação da inflamação pela microglia promove constante dano ao SNC, que se associa com uma série de doenças neuro-degenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (BLOCK et al., 2007; SOLITO & SASTRE, 2012).

A atividade anti-inflamatória dos glicocorticoides, seja nos sistemas periféricos ou no SNC, se dá pelos mecanismos envolvendo a proteína ANXA1, como já mencionado. Vários estudos realizados ao longo dos últimos anos têm provado a importância da ANXA1 no controle homeostático da inflamação no SNC, onde é sabidamente responsável por manter a integridade da barreira hemato-encefálica, regular funções neuroendócrinas e prevenir tanto a migração de leucócitos ao SNC como a ativação inflamatória de células da microglia (CRISTANTE et al., 2013; JOHN et al., 2007; MAGGIOLI et al., 2016; SMITH et al., 2015; SOLITO et al., 2008).

Estudos mostram que a ANXA1 secretada no SNC interage não só com neutrófilos apoptóticos e outras células responsáveis pela imunidade, mas também o faz com neurônios quando é necessário sua eliminação, estimulando a fagocitose destas células em condições não inflamatórias, o que demonstra que a ANXA1 é imprescindível para a manutenção de condições homeostáticas mesmo sob a ausência de um estímulo provocado por uma injúria (JOSEPH et al., 2012; MCARTHUR et al., 2010). Em estudos envolvendo roedores deficientes de ANXA1, estímulo inflamatório provocado pela administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou por indução de isquemia mostra uma exacerbação da resposta inflamatória no SNC em comparação com animais selvagens sob o mesmo estímulo, e é possível constatar aumento de

migração e adesão de leucócitos. Nestas condições, reposição com peptídeos miméticos de ANXA1 aos animais geneticamente deficientes da proteína são capazes de reduzir o número e a capacidade de adesão de leucócitos direcionados ao SNC, bem como a ativação de células microgliais. Nas mesmas condições inflamatórias, ocorre um aumento da expressão de ANXA1 em animais selvagens, o que evidencia a importância da ANXA1 no controle de lesões inflamatórias de maneira generalizada, independentemente do estímulo que as desencadeiam (GAVINS et al., 2007; GAVINS et al., 2012; SMITH et al., 2015).

A ANXA1 é superexpressa em doenças crônicas envolvendo o SNC, como esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e neoplasias cerebrais, como astrocitomas e glioblastomas (SOLITO et al., 2008). Em tumores, a maior expressão de ANXA1 se associa com a malignidade dos mesmos; da mesma forma, em outras doenças crônicas do SNC, especula-se que a ANXA1 seja expressa pelas células microgliais na tentativa de que a proteína reverta a injúria inflamatória presente (SCHITENHELM et al., 2009). A ANXA1 também atua como importante fator para regulação de *tight junctions* que mantêm a barreira hemato-encefálica íntegra; em vários pacientes que sofrem de esclerose múltipla, por exemplo, já foi verificado que expressão reduzida de ANXA1 compromete a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, e isto se associa com o agravamento da doença (MCARTHUR et al., 2016). Além disso, em modelos murinos de hemorragia cerebral envolvendo comprometimento da barreira hematoencefálica, foi verificado que a ANXA1 não só tem sua expressão aumentada como é também fosforilada em diferentes sítios em resposta à injúria, evidenciando sua ação fisiológica em reverter danos inflamatórios causados ao SNC (WANG et al., 2016).

Associadas, as informações apresentadas sobre as funções da ANXA1 no SNC evidenciam a relevância da proteína para o controle da inflamação neste sistema e que a ausência da mesma pode ser um agravante em doenças neurodegenerativas.

1.4. PPAR γ , modulação endógena da inflamação e fagocitose

Também conhecidos como *receptores ativados por proliferadores de peroxissoma*, os PPAR fazem parte de uma família de receptores nucleares. Os PPAR exercem inúmeras funções metabólicas por meio de sua interação com moléculas ligantes, que por sua vez alteram a conformação dos PPAR e os levam a se ligarem a regiões gênicas chamadas *elementos de resposta de proliferadores de peroxissoma* (PPRE), fazendo com que haja aumento ou redução transcricional de genes ligados ao PPRE ativado. Um dos ligantes naturais endógenos dos receptores PPAR mais estudados é a chamada 15d-prostaglandina J2 (TONTONNOZ & SPIGELMAN, 2008).

Os receptores PPAR possuem dois domínios principais, um responsável pela ligação do receptor ao DNA e outro responsável pela ligação com determinado agonista (ou antagonista). A extensão C-terminal contém o domínio AF2, o principal fator responsável pela indução da transcrição de outros genes, enquanto a extensão N-terminal contém variações estruturais e suas funções ainda não estão bem estabelecidas, mas sabe-se que possui alguma atividade transcricional e, também possivelmente, promove regulação inibitória da ativação de PPAR (BERGER & MOLLER, 2002).

Existem três isoformas principais dos PPAR descritas até o momento (conhecidas como PPAR γ , PPAR δ/β e PPAR α), expressas em diferentes tecidos e responsáveis por inúmeras funções. Enquanto as isoformas α e δ/β são mais comuns em tecidos hepáticos e gastrintestinais, a isoforma γ é expressa principalmente nos adipócitos, mas também é consideravelmente expressa em células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas e em menor extensão em vários outros tipos celulares. Suas funções clássicas incluem controle da diferenciação de adipócitos e controle da sensibilidade à insulina (BRAISSANT et al., 1996; CROASDELL et al., 2015; HONG & TONTONNOZ, 2008; TONTONNOZ & SPIEGELMAN, 2008). No caso do PPAR γ , já foram descritas ainda as isoformas $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$; enquanto as isoformas $\gamma 1$ e $\gamma 3$ são bastante similares, a isoforma $\gamma 2$ possui uma região N-terminal maior, contendo 30 aminoácidos. A expressão de tais isoformas ainda não é complementamente conhecida, mas sabe-se que, além de serem expressas em células

adiposas, a isoforma $\gamma 1$ pode ser também encontrada em várias células imunes e ao longo do tecido gastrointestinal, enquanto a isoforma $\gamma 2$ é expressa primariamente apenas em adipócitos (JANINI & KUMARI, 2015). A isoforma $\gamma 3$ ainda foi pouco estudada, e não há muita informação sobre tal isoforma na literatura científica. As três isoformas descritas controlam a adipogênese, diferenciação de adipócitos e regulação do metabolismo energético em alguma extensão, mas a isoforma $\gamma 2$ parece ser a maior responsável pelo controle do metabolismo energético mediante ingestão de nutrientes ou em condições de obesidade, enquanto a isoforma $\gamma 1$ aparenta se associar mais facilmente com efeitos vinculados ao sistema imunológico (FEIGE et al., 2006; JANINI & KUMARI, 2015).

O PPAR γ foi identificado como importante modulador de processos inflamatórios por meio de regulação gênica em células de origem mielóide. A expressão de PPAR γ é aumentada em células monocíticas em processo de diferenciação a macrófagos, em macrófagos ativos e em células dendríticas durante a inflamação (TONTONNOZ & SPIEGELMAN, 2008). De fato, fármacos pertencentes à classe das glitazonas são utilizados há décadas para o controle de distúrbios metabólicos provocados pela diabetes, e o mecanismo de ação pelo qual estes fármacos atuam é justamente o agonismo de PPAR γ , que ocasiona não só sensibilização de células à insulina, mas também melhor modulação do processo inflamatório concomitante (MURPHY & HOLDER, 2000). Tal capacidade de inibição do processo inflamatório que acompanha a diabetes tem levado a estudos que buscam investigar a capacidade de agonistas de PPAR γ de tratarem doenças, almejando diretamente a resolução do processo inflamatório principal. Em murinos induzidos a desenvolvimento de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro, tratamento com rosiglitazona é capaz de reduzir a atividade de metaloproteases que desencadeiam processo inflamatório bem como prevenir o processo de morte celular programada de células alveolares (HOU et al., 2015). Em outro modelo murino de asma provocada por administração de ovoalbumina, animais tratados com rosiglitazona apresentaram níveis de IgE e de enzimas geradoras de espécies reativas de oxigênio como superóxido dismutase e catalase reduzidos, atenuando o processo inflamatório associado à condição gerada nos animais (EL-NAA et al., 2015).

Os eventos celulares promovidos pela ativação de PPAR γ que levam à resolução da inflamação já foram descritos na literatura científica. É relevante a modulação da produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo que a ativação de PPAR γ reduz a produção de TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 e aumenta a produção de IL-10 e TGF (STRAUS & GLASS, 2007; TONTONNOZ & SPIEGELMAN, 2008). Outro efeito decorrente da ativação de PPAR γ é a redução do influxo de neutrófilos em tecidos inflamados, e além disso, neutrófilos já presentes no tecido entram em apoptose mediante ativação deste receptor; efeito similar é também visto em macrófagos, onde PPAR γ inibe o tráfego destas células para tecidos inflamados e reduz suas capacidades quimiotáticas (CROASDELL et al., 2015). A ativação de PPAR γ também leva à redução da transcrição gênica de receptores *toll-like* envolvidos com o reconhecimento de patógenos e consequente inflamação (STRAUS & GLASS, 2007). Todos estes efeitos tendem a ser bastante dependentes da ativação de PPAR γ , pois diferentes agonistas do receptor promovem modulação da resposta inflamatória em diferentes magnitudes, e bloqueio do receptor abole os efeitos anti-inflamatórios de prostaglandinas que sabidamente interagem com o PPAR γ , como a prostaglandina J2 (STRAUS & GLASS, 2007; TONTONNOZ & SPIEGELMAN, 2008). Além disso, a ativação de PPAR γ por agonistas também promove efeitos anti-inflamatórios por vias não-canônicas, uma vez que tiazolidinedionas são capazes, por vias de PPAR γ , não só de prevenir a produção de TNF- α e NF- κ B, mas também inativam NF- κ B já produzido por aumentarem a ativação de I κ B- α , atenuando o processo inflamatório por vias trans-repressivas (ZHANG et al., 2015).

Adicionalmente, em modelos de cultura de células humanas, durante o processo de diferenciação de macrófagos, a ativação de PPAR γ promove a polarização M2 de macrófagos ao induzir uma resposta Th2 anti-inflamatória; macrófagos assim polarizados também inibem as ações de macrófagos M1, o que converge ainda mais para um perfil anti-inflamatório (BOUHLEL et al., 2007). Em modelos animais de inflamação crônica em asma, a ativação de PPAR γ por meio de agonistas reduz a migração de eosinófilos e melhora o fluxo e as condições teciduais das vias aéreas superiores, o que sugere que este receptor está também envolvido com o controle de alergias (LEE et al., 2005).

Fig. 3. Mecanismos transcricionais decorrentes da ativação de PPAR γ e consequentes efeitos anti-inflamatórios (adaptado de Daynes e Jones, 2002 e Szeles et al., 2007). A imagem A demonstra possíveis mecanismos pelos quais o PPAR γ , quando ativado, modula a transcrição gênica de fatores vinculados ao processo inflamatório. O PPAR γ pode, ao ser ativado e interagir com o receptor retinóide X (RXR): se ligar a outros co-fatores necessários à transcrição de outros genes, tornando-os indisponíveis para uso por outros fatores de transcrição (TF, na imagem); realizar “ligações cruzadas” com fatores de transcrição, impedindo-os de realizar suas funções; inibir a ação de MAPKs, que se tornam incapazes de fosforilar e ativar fatores de transcrição. A imagem B esquematiza os efeitos de agonistas de PPAR γ (prostaglandina J2 e fármacos tiazolidínicos) em diferentes células do sistema imune; tais efeitos são bastante variados, mas sempre convergem para redução do processo inflamatório.

Tal qual a proteína ANXA1, uma das funções exercidas pelo PPAR γ na resolução da inflamação é a indução da fagocitose de células apoptóticas por

macrófagos. Em estudos realizados com linfócitos T da linhagem Jurkat, é demonstrado que a apoptose destas células provoca polarização de macrófagos M1 para M2 em intensidade comparável a agonistas clássicos de PPAR γ , como a rosiglitazona, o que resulta na fagocitose dos linfócitos. Ademais, os linfócitos íntegros ou necróticos não promovem tal efeito (KNETHEN et al., 2013). Em modelos envolvendo macrófagos oriundos de ateroscleromas, a ativação de PPAR γ por agonistas provoca indução direta da fagocitose de células em apoptose, efeito abolido quando RNA de interferência compromete a expressão de PPAR γ (CHINETTI-GBAGUIDI et al., 2011). Efeitos similares são observados em modelos de peritonite induzida em animais, na qual macrófagos obtidos da área inflamada são induzidos a fagocitarem neutrófilos apoptóticos mediante ativação do receptor de PPAR γ , tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, efeito que é acompanhado pelo aumento da liberação de IL-10 e TGF- β (BOYANAPALLI et al., 2010).

Todos os eventos celulares decorrentes da ativação de PPAR γ que levam à fagocitose de células apoptóticas e resolução do processo inflamatório não são completamente conhecidos, mas certos fatores vinculados a tais eventos já foram descritos na literatura científica. A proteína transmembrana CD36 é expressa por diferentes tipos celulares, como monócitos, plaquetas, células endoteliais, miócitos e também macrófagos, funcionando como um receptor capaz de se ligar a ácidos graxos, lipoproteínas oxidadas, componentes bacterianos e células senescentes (PARK, 2014). Em vários tipos celulares, PPAR γ , quando ativado, promove aumento da expressão de CD36; em macrófagos, a relação de PPAR γ com CD36 envolve primariamente a fagocitose de LDL oxidada e formação de células esponjosas que culminam em aterosclerose (PARK, 2014; WANG et al., 2015). Entretanto, outros estudos sugerem que a expressão de CD36 por macrófagos mediada por PPAR γ leva também ao aumento da fagocitose de células em apoptose, acentuando a resolução de processos inflamatórios (ASADA et al., 2004). Em modelos experimentais envolvendo macrófagos humanos evidencia-se o papel anti-inflamatório exercido pela proteína CD36, onde bloqueio de PPAR γ por antagonistas reduz a expressão de CD36 e, conseqüentemente, reduz-se a fagocitose de células apoptóticas (MAJAI et al., 2007).

Como descrito acima, a ativação de PPAR γ por agonistas funciona como um processo modulador da inflamação, embora todos os mecanismos envolvidos neste processo não sejam ainda bem elucidados.

1.5. PPAR γ e microglia

Como descrito anteriormente, a microglia corresponde ao conjunto de macrófagos residentes no sistema nervoso central. Tais células desempenham várias funções, envolvendo principalmente imunidade e homeostasia neuronal (GLEZER et al., 2007).

Além da ANXA1, o PPAR γ funciona também como modulador da inflamação no SNC, contribuindo para sua resolução. Na microglia, este receptor, quando ativado, seja endogenamente ou exogenamente, promove uma série de efeitos anti-inflamatórios: modulação da expressão de receptores *toll-like* e repressão de STAT1 (um fator *downstream* a partir da ativação de receptores *toll-like*); inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (como TNF α e IL-6) e indução da produção de citocinas anti-inflamatórias (como TGF β e IL-10); redução da liberação de NO e consequente redução do dano oxidativo; redução da atividade da ciclo-oxigenase 2; bloqueio da apresentação de antígenos via MHC-II; redução da migração leucocitária; aumento da atividade de enzimas anti-oxidantes; entre outros efeitos (BERNARDO & MINGHETTI, 2006; GURLEY et al., 2008, KAPADIA et al., 2009; MADEIRA et al., 2015; NUCCIO et al., 2015). Além disso, a ativação de PPAR γ leva a ações que indiretamente preveninem injúrias à microglia, uma vez que o receptor promove efeitos anti-inflamatórios que afetam o SNC como um todo, como a redução da expressão de moléculas de adesão *intracellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) por células endoteliais, prevenindo a infiltração de neutrófilos através da barreira hemato-encefálica, e a prevenção de danos inflamatórios e oxidativos em oligodendrócitos (BERNARDO & MINGHETTI, 2006; KAPADIA et al., 2009).

A resolução da inflamação promovida pelo PPAR γ tem importância tanto em situações agudas, como isquemia, infarto e trauma, quanto em situações crônicas, como diversas doenças neurais degenerativas (BERNARDO & MINGHETTI, 2006). De

fato, PPAR γ vem sendo estudado como um potencial alvo para a farmacoterapia de doenças cerebrais, como as doenças de Alzheimer e Parkinson e a esclerose múltipla (CARTA & PISANU, 2013; PEREZ & QUINTANILLA, 2015). Além disso, fármacos da classe das tiazolidinedionas já estabelecidos para outros tipos de farmacoterapia (como a já mencionada rosiglitazona) exercem efeitos além dos tradicionais efeitos anti-inflamatórios, podendo, por exemplo, reduzir os efeitos adversos vistos em outros fármacos utilizados em primeira escolha para tratamento de certas doenças neurodegenerativas, como a discinesia induzida por levodopa utilizada na farmacoterapia da doença de Parkinson (MARTINEZ et al., 2015; SONG et al., 2016). Os mecanismos até então descritos na literatura científica incluem promoção de efeito anti-inflamatório geral, redução do dano oxidativo causado por condições de estresse, prevenção da apoptose de neurônios e regulação direta das células da microglia pelo PPAR γ , que por sua vez, como já descrito anteriormente, leva a modulação de vários genes induzindo a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (BERNARDO & MINGHETTI, 2006; CARTA & PISANU, 2013; KAPADIA et al., 2009).

Em modelos animais que simulam distúrbios motores característicos da doença de Parkinson, agonistas de PPAR γ administrados concomitantemente com o estímulo deletério ao SNC previnem, quase completamente, disfunções cognitivas quando se compara com animais que não receberam o mesmo tratamento com agonistas de PPAR γ (SCHINTU et al., 2009). Em modelos de cultura celular primária, células da microglia expostas a estímulo inflamatório pela ação do LPS apresentam elevação da produção de NO e citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 e TNF α ; tais parâmetros são revertidos quando as células são tratadas com diferentes agonistas sintéticos de PPAR γ , ainda que o efeito não seja tão pronunciado quando comparado com o efeito promovido por agonistas naturais endógenos de PPAR γ (STORER et al., 2005). Ainda, em modelos de cultura celular, estímulo inflamatório promovido pelo NO é prevenido mediante administração de agonistas de PPAR γ , que melhora o perfil anti-oxidante cerebral ao aumentar a atividade da enzima catalase, e, também, previne o dano inflamatório causado a neurônios corticais (GRAY et al., 2012).

Como já descrito anteriormente, a ativação de PPAR γ em macrófagos é capaz de atenuar o processo inflamatório mediante aumento da expressão de CD36,

que leva à fagocitose de células apoptóticas. O mesmo efeito fagocítico anti-inflamatório é visto em células da microglia (STOLZING & GRUNE, 2004). Na doença de Alzheimer, por exemplo, formam-se complexos neurofibrilares e depositam-se *debris* celulares no cérebro que provocam inflamação da microglia; o uso de agonistas de PPAR γ promove redução da atividade inflamatória microglial enquanto favorece a fagocitose destes complexos deletérios, efeito este dependente da expressão de CD36 na microglia (YAMANAKA et al., 2012). Adicionalmente, em camundongos sujeitos a infarto cerebral mediante isquemia, o uso de um agonista de PPAR γ aumenta a expressão de CD36, efeito que se associa ao aumento da fagocitose de neutrófilos apoptóticos (BALLESTEROS et al., 2014).

Como mostrado, é evidente que ativação do PPAR γ é um importante mecanismo modulador da inflamação no SNC; o conhecimento dos mecanismos endógenos que controlam a expressão e função deste receptor na microglia é importante para melhor entendimento da gênese de doenças do SNC.

2. JUSTIFICATIVA

Existe uma enorme lacuna quanto ao conhecimento relativo à farmacoterapia para doenças neurodegenerativas. O desenvolvimento de novos fármacos para tratamento destas doenças caminha a passos lentos em grande parte justamente porque sequer se conhecem toda a patogênese de tais doenças, mas sabe-se que boa parte destas doenças contêm elementos inflamatórios em sua patogênese. Dados do nosso grupo de pesquisa têm mostrado um mecanismo ainda não descrito da ANXA1 sobre a eferocitose, uma vez que temos evidenciado que a ANXA1 endógena é capaz de controlar a expressão de PPAR γ em macrófagos e a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos mediada por agonistas de PPARs. Além disso, como salientado na introdução deste trabalho, estudos presentes na literatura científica têm mostrado que tanto a ANXA1 como o PPAR γ são importantes moduladores da inflamação e de outras funções fisiológicas em geral de células da microglia. Assim, a elucidação das interações entre ANXA1 e PPAR γ e dos efeitos que decorrem destas interações em células da microglia torna-se de grande importância para fornecer bases

científicas sólidas acerca de mecanismos inflamatórios no SNC de onde possam surgir novas pesquisas que beneficiem a farmacoterapia de doenças neurodegenerativas.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a modulação exercida pela ANXA1 sobre a expressão e função de PPAR γ em células da micróglia e os possíveis mecanismos moleculares de ação responsáveis por tal modulação.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

1. Determinar se a ANXA1 é capaz de modular a expressão proteica de PPAR γ ;
2. Determinar se a ANXA1 é capaz de modular a expressão gênica de PPAR γ ;
3. Investigar quais os mecanismos moleculares que medeiam a interação entre ANXA1 e PPAR γ (principalmente STAT6 e CREB);
4. Verificar se a fagocitose de células apoptóticas por células BV2 mediada por ANXA1 é dependente de PPAR γ ou não;
5. Verificar se a expressão de CD36 é modulada pelas ações da ANXA1.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Cultura e manutenção de células

Todos os experimentos foram realizados com células BV2 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. Células BV2 compõem uma linhagem de células microgliais imortalizadas oriundas de camundongos neonatos, comumente utilizadas em estudos envolvendo inflamação do SNC (BOCCHINI et al., 1992; STANSLEY et al.,

2012). O perfil inflamatório destas células já foi descrito como sendo bastante similar ao visto em microglia primária (HENN et al., 2009). Células BV2 utilizadas em experimentos foram mantidas em garrafas de cultura em meio RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil), sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. O meio de cultura das células foi trocado a cada 2-3 dias.

Os experimentos envolvendo fagocitose foram realizados também com células PC12 adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, além de células BV2. Células PC12 são células murinas imortalizadas oriundas de feocromocitomas, mas que dispõem de toda a maquinaria celular característica de neurônios (GREENE & TISCHLER, 1976). Tais células já foram descritas por outros autores como viáveis em testes de fagocitose envolvendo células BV2 (MCARTHUR et al., 2010). Células PC12 utilizadas em experimentos foram mantidas em garrafas de cultura em meio RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil), sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. O meio de cultura das células foi trocado a cada 2-3 dias, de forma idêntica à descrita para as células BV2. Antes da realização de experimentos de fagocitose, células PC12 foram repassadas para garrafas ou placas de cultura previamente tratadas com colágeno tipo I (Corning, Corning, NY, EUA), em concentração de 15 µg/mL, e então induzidas à apoptose.

5.2. Indução de células PC12 à apoptose

Células PC12 foram plaqueadas em poços de placas de cultura em quantidade de cerca de 3×10^5 ; após 24 h, já aderidas as células ao fundo da placa, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com solução salina 0,9% (PBS). O meio de cultura foi, então, substituído por novo meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) contendo soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil) em concentrações de 0 ou 0,1%. As células permaneceram em cultura sob estas condições por períodos de 24 e 48 h. Após o período de incubação, as células foram coletadas das placas de cultura mediante

tripsinização (diluição 1/2 em PBS) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil e marcadas com proteína anexina V-APC 1/100 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) e iodeto de propídio 1/100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) mediante instruções do fabricante, e submetidas a leitura por citometria de fluxo para verificação de viabilidade celular em equipamento FACSCanto II® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos).

5.3. Transfecção de células BV2

Células BV2 foram transfectadas com plasmídeo pRc/CMV® (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) contendo um fragmento de 1040 pares de bases proveniente de cDNA da proteína ANXA1 humana em orientação *sense* (aumento da expressão de ANXA1). Um outro grupo de células foi transfectado da mesma forma, mas com um fragmento de 476 pares de bases correspondentes a proteína ANXA1 humana em orientação *anti-sense* (redução da expressão de ANXA1). Estes plasmídeos foram fornecidos pela colabadora Dr. Egle Solito, do William Harvey Research Institute, Queen's Mary University, Reino Unido (SOLITO et al., 1998). Para transfecção, brevemente, 3×10^5 células BV2 foram plaqueadas em placas de cultura. Plasmídeos foram preparados em uma solução de Fugene-6® (Promega Corporation, Fitchburg, WI, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante, e adicionados a cada poço da placa de cultura contendo células BV2 confluentes. As células permaneceram em contato com os plasmídeos dessa forma por 48 h, a 37 °C, em concentração de CO₂ de 5%, sem qualquer agitação. Após realização do processo de transfecção, as células foram tratadas com geneticina (G-418) (Promega Corporation, Fitchburg, WI, Estados Unidos) em concentrações crescentes, partindo de 400 µg/mL no dia inicial de tratamento até 1000 µg no último dia de tratamento. Este processo de tratamento foi realizado por 14 dias. Ao final deste período, as células que permaneceram nas placas de cultura e não foram destruídas pela geneticina foram comprovadas como efetivamente transfectadas e utilizadas em experimentos.

5.4. Tratamento de células BV2

Células BV2 foram plaqueadas em placas de cultura em quantidade de 1×10^6 células/poço (para realização de RT-PCR e *Western Blotting*) ou 2×10^5 células/poço (para realização de teste de fagocitose e ou para verificação de expressão de CD36) e mantidas em condições de cultura descritas previamente. Após aderência, as células foram tratadas com: pioglitazona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), um agonista PPAR γ específico, em concentração de 100 μ M, por um período de 120 minutos; GW9662 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), um antagonista PPAR γ específico, em concentração de 50 μ M, por um período de 90 minutos; ou com ANXA1 recombinante (rANXA1), cedida pelo Dr. Chris Reutelingsperger (Cardiovascular Research Institute Maastricht, Holanda), em concentrações variando de 0,1 até 100 nM por períodos de 60 ou 120 minutos, conforme a necessidade experimental. Em qualquer circunstância onde as células foram tratadas com pioglitazona, outro grupo de células foi também tratado com o veículo utilizado para dissolução da pioglitazona – dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, SP, Brasil) em concentração 0,03 %. Quando necessário tratar as células com ANXA1 juntamente com pioglitazona, o tratamento com rANXA1 precedeu o tratamento com pioglitazona em todos os experimentos realizados, com lavagem das células com PBS entre tratamentos. No caso dos experimentos envolvendo fagocitose e GW9662, o tratamento com rANXA1 ocorreu simultaneamente com o tratamento com GW9662, que inclusive permaneceram em contato com as células durante a realização do processo de fagocitose, sem lavagens com PBS entre tratamentos e realização de fagocitose. Ao final dos tratamentos, dependendo do propósito experimental, as células BV2 foram: coletadas mediante tripsinização e congeladas a -20 °C até futura realização de *Western Blotting*; coletadas mediante tripsinização e armazenadas em trizol para futura extração de RNA e realização de RT-PCR; adicionadas de células PC12 previamente induzidas à apoptose para realização de teste de fagocitose; coletadas mediante tripsinização e imediatamente marcadas com anti-CD36 e analisadas. Todas as formas de tratamento descritas nesta seção (concentração e tempo) envolvendo rANXA1, pioglitazona e/ou GW9662 foram estabelecidas com base

tanto em demais estudos presentes na literatura científica que descrevem formas similares de tratamento e de estudos prévios realizados em nosso laboratório envolvendo tais substâncias (SOLITO et al., 2003; TAKAHAMA, 2016; WANG et al., 2015; WOSTER & COMBS, 2007).

5.5. Western blotting (WB)

Material proteico produzido por células BV2 após tratamentos foi obtido por sonicação da massa de células imersa em tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) - composto de tampão fosfato salina, deoxicolato de sódio (Amresco, Solon, OH, Estados Unidos), Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e dodecil sulfato de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil) contendo metilfenilsulfonilflúor 1 μ M (PMSF) (Amresco, Solon, OH, Estados Unidos), coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e coquetel inibidor de fosfatases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). A quantificação do material proteico foi realizada pelo método de Bradford. Aproximadamente 50 μ g de proteína/poço foram colocadas em poços de gel de poliacrilamida 12,5% confeccionado manualmente, e submetidas a separação proteica por eletroforese em gel de poliacrilamida com auxílio de dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE) (Synth, Diadema, SP, Brasil) por 120 minutos a 90 V. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polividina (PVDF) (EMD Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) previamente ativada com metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) por eletroforese por 90 minutos a 130 V. Bloqueio de sítios não-específicos foi realizado mediante tratamento da membrana de nitrocelulose por 60 minutos com pó de leite 5% em TBS-Tween 20 (TBS-T), composto de 50 mmol Tris-HCl (Synth, Diadema, SP, Brasil), 200 mmol NaCl₂ (Synth, Diadema, SP, Brasil) e 0.1% Tween-20 (Synth, Diadema, SP, Brasil). As membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anti-corpo primário anti-PPAR γ de coelhos (Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-STAT6 de coelhos (Abcam, Cambridge, Reino Unido) ou anti-CREB de coelhos (Cell Signaling, Danvers, MA, Estados Unidos). Para anti-PPAR γ e anti-STAT6, foi utilizada diluição 1/1000 em TBS-T contendo pó de leite 3% por período de tempo *overnight* a 4 °C. Para anti-CREB,

foi utilizada diluição 1/500 em TBS-T contendo albumina sérica bovina 5% por período de tempo *overnight* a 4 °C. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anti-corpo secundário *anti-rabbit* (Abcam, Cambridge, Reino Unido) em diluição 1/3000 em TBS-T por 120 minutos, a temperatura ambiente. Por fim, as membranas foram lavadas com TBS-T e reveladas com reagentes ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) por quimioluminescência por um instrumento Amersham Imager 600® (GE Health Care Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). A intensidade das bandas específicas para PPAR γ , STAT6 e CREB foi comparada com a intensidade de bandas obtidas para β -actina ou Akt, analisadas por densitometria.

5.6. Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Material genético (RNA) produzido por células BV2 foi obtido após realização dos tratamentos. Inicialmente, as células foram imersas em trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), e posteriormente armazenadas em tubos livres de RNase a -80 °C *overnight*. Após lise do material celular, foi adicionado álcool isoamílico/clorofórmio (1:5) (Synth, Diadema, SP, Brasil) à solução de trizol para extração do material genético; as amostras foram agitadas manualmente vigorosamente e depois centrifugadas a 12000 g a 4 °C por 15 minutos em centrífuga 5810R® (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A fase aquosa foi separada e adicionada de álcool isopropílico (Synth, Diadema, SP, Brasil) para precipitação de material genético contido na fase aquosa e armazenada a -20 °C *overnight*. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 12000 g a 4 °C por 15 minutos; o *pellet* de RNA obtido foi então lavado uma vez com álcool 95% livre de RNases e novamente com álcool 75% livre de RNases, sendo a solução toda centrifugada a 7500 g a 4 °C por 5 minutos ao final das lavagens. Os *pellets* de RNA foram mantidos em recipientes abertos em temperatura ambiente por 10 minutos para evaporação de resquícios de álcool. Aos tubos contendo *pellets* foi então adicionado 30 μ L de água livre de RNases, e os tubos foram mantidos a 55 °C em Thermomixer Compact® (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por 10 minutos para completa evaporação do álcool. A concentração de RNA livre em solução foi aferida em equipamento NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados

Unidos), e a qualidade do material genético foi observada pela verificação da relação das absorbâncias a 260 nm sobre 280 nm. Um total de 1 µg de RNA foi tratado com DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para eliminação de DNA contaminante em termociclador Mastercycler® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) sob as seguintes condições de ciclagem: 37 °C por 15 minutos (1x), 75 °C por 15 minutos (1x) e 42 °C por 2 minutos (1x). Ao final do tratamento com DNase, o RNA obtido foi adicionado de Superscript VILO® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) conforme instruções do fabricante e levado ao termociclador para obtenção de cDNA sob as seguintes condições de ciclagem: 42 °C por 60 minutos (1x), 70 °C por 5 minutos (1x), 37 °C por 2 minutos (1x) e 4 °C por 15 minutos (1x). Para realização de RT-PCR propriamente dito, 10 ng de RNA por amostra foram colocados em placa de reação juntamente com *primers* para PPAR γ (sequência *forward*: 5' CACAGAGATGCCATTCTGGC 3'; sequência *reverse*: 5' GGCCTGTTGTAGAGCTGGGT 3'; Eurofins Genomics, Huntsville, AL, Estados Unidos) em concentração 200 nM e reagentes Fast SYBR® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), conforme instruções do fabricante. A mesma reação foi realizada em outros poços da mesma placa com *primers* para o gene endógeno de controle 18S (sequência *forward*: 5' GTAACCCGTTGAACCCATT 3'; sequência *reverse*: 5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'; Eurofins Genomics, Huntsville, AL, Estados Unidos) em concentração 600 nM. A reação de RT-PCR foi realizada em termociclador ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) sob as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 minutos (1x), 95 °C por 10 segundos e 60 °C por 1 minuto (40x). A quantificação da expressão gênica foi realizada segundo o método de Delta-DeltaCT ($\Delta\Delta C_t$) (LIVAK, 2001).

Para padronização do teste de RT-PCR, os *primers*, tanto para o gene de interesse (PPAR γ) como para o gene de referência (18S), foram testados em diferentes concentrações (200, 400 e 600 nM) em combinação com diferentes quantidades de material genético (1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 ng) obtido de células não tratadas. A melhor condição reacional foi definida com base na análise visual da *melt curve* de melhor eficiência.

5.7. Fagocitose de células PC12 por células BV2

Células BV2, após tratamentos descritos no item 5.4, foram colocadas em co-cultura com células PC12 para realização de teste de fagocitose. Inicialmente, um total de 2×10^5 células BV2 foram plaqueadas por poço e mantidas em meio de cultura como descrito anteriormente. As células BV2 assim plaqueadas foram então tratadas conforme a necessidade experimental, como descrito anteriormente. Em seguida, células PC12 apoptóticas foram adicionadas a placas de cultura contendo células BV2 já tratadas. Previamente ao tratamento de células BV2, células PC12 em cultura foram induzidas à apoptose (48 h em cultura em deprivação completa de soro), coletadas mediante tripsinização e marcadas com carboxifluoresceína succinimidil-éster (Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit®) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). As células PC12 foram lavadas com PBS, imersas em solução de CFSE $5 \mu\text{M}$, mantidas em leve agitação por 10 minutos e novamente lavadas. Cerca de 6×10^5 células PC12 apoptóticas já marcadas foram colocadas por poço contendo células BV2 tratadas (células PC12 em relação 3:1 com as células BV2 para que a quantidade de células não fosse um fator limitante para a realização de fagocitose). As células foram mantidas em co-cultura por 30 ou 60 minutos, conforme a necessidade experimental (padronização de metodologia ou realização de experimentos). Após tempo de co-cultura, o sobrenadante foi descartado (para que quaisquer células PC12 não fagocitadas fossem removidas) e as células BV2 foram coletadas mediante tripsinização, lavadas com PBS e marcadas com anti-corpo anti-F4/80 Pe-Cy5 por 30 minutos (1/100) (eBiosciences, San Diego, CA, Estados Unidos). As células BV2 foram então ensaiadas em citômetro de fluxo FacsCanto II® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) ou Accuri C6® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) para análise de fagocitose; 10000 eventos totais por amostra foram utilizados para análise.

5.8. Expressão de CD36 por células BV2

Células BV2 foram coletadas após tratamento mediante tripsinização, lavadas com PBS para remoção de resquícios de meio de cultura e tripsina e marcadas com anticorpo anti-CD36 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), diluído 1/100 em PBS. As células foram mantidas em temperatura ambiente em repouso por 30 minutos em contato com anticorpo para que a marcação ocorresse eficientemente. Após o período de repouso, as células foram ensaiadas em citômetro de fluxo Accuri C6® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) para análise da expressão de CD36; 10000 eventos totais por amostra foram utilizados para análise.

5.9. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0®. Os dados foram analisados por comparação de médias por meio de testes t de Student (para comparação de dois grupos) ou por meio de testes de ANOVA seguidos de testes *post-hoc* de Tukey-Kramer (para comparação entre três ou mais grupos). Os resultados obtidos estão representados como média $\pm$ erro-padrão da média. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os resultados são todos (à exceção dos resultados referentes à análise de fagocitose) demonstrados em gráficos assumindo o grupo controle ou grupo de células não transfectadas e não tratadas como base para normalização dos demais resultados (assumem-se os valores base como iguais a 1).

6. RESULTADOS

6.1. Efeito da ANXA1 exógena e endógena sobre a expressão proteica de PPAR γ

Células BV2 foram tratadas com rANXA1 em concentrações crescentes, variando de 0,1 até 100 nM por 60 minutos, e a análise da expressão proteica de

PPAR γ foi realizada. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com 100 nM de rANXA1 aumentou a expressão de PPAR γ (Fig. 4).

Fig. 4. Expressão proteica de PPAR γ por células BV2 após tratamento com rANXA1. Células BV2 tratadas com rANXA1 em concentrações crescentes variando de 0,1 a 100 nM por 60 min foram avaliadas quanto a expressão de PPAR γ por *Western Blotting*. Resultados mostrados como razão da expressão de PPAR γ por β -actina. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicatas. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Com o intuito de investigar se a ANXA1 poderia alterar o efeito de um ligante de PPAR γ , as células BV2 foram tratadas com rANXA1 e posteriormente com pioglitazona. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com pioglitazona reduziu a expressão de PPAR γ , a qual foi revertida pelo pré-tratamento com rANXA1, reforçando o papel da ANXA1 exógena na indução da expressão de PPAR γ (Fig. 5).

Fig. 5. Expressão proteica de PPAR γ por células BV2 após tratamento com rANXA1 e pioglitazona. Células BV2 tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 120 min e posteriormente com pioglitazona em concentração de 10 μ M por 120 minutos foram avaliadas quanto a expressão de PPAR γ por *Western Blotting*. Resultados mostrados como razão da expressão de PPAR γ por β -actina. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos realizados em quadruplicatas. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. ** $p < 0,01$ em comparação com respectivos controles. # $p < 0,05$ em comparação com os grupos veículo e pioglitazona.

Para analisar o papel da ANXA1 endógena sobre a expressão de PPAR γ foram empregadas estratégias de biologia molecular para reduzir a expressão da proteína. Este ensaio foi padronizado em nosso laboratório. Células BV2 foram transfectadas com plasmídeos contendo diferentes sequências referentes ao gene ANXA1. Um grupo de células foi transfectado com um plasmídeo contendo um fragmento do gene em orientação anti-sense (redução da expressão de ANXA1), enquanto outro grupo de células foi transfectado com um fragmento do gene em orientação sense (aumento da expressão de ANXA1). Para confirmação de que a transfecção resultou de fato em alteração da expressão de ANXA1, a expressão da proteína foi verificada por *Western Blotting*. Avaliação visual e controle com antibióticos das células que receberam o plasmídeo indicaram que as células foram transfectadas com sucesso. Contudo, avaliação da expressão de ANXA1 por *Western Blotting* demonstrou que a transfecção das células com plasmídeo contendo uma sequência sense não resultou em aumento significativo da expressão de ANXA1, enquanto a transfecção com plasmídeo contendo uma sequência anti-sense resultou em redução da expressão de ANXA1 de forma significativa (Fig. 6).

Fig. 6. Expressão proteica de ANXA1 por células BV2 transfectadas. Células BV2 transfectadas com plasmídeos contendo sequências *anti-sense* e *sense* para ANXA1 foram avaliadas quanto a expressão de ANXA1 por *Western Blotting*. Resultados mostrados como razão da expressão de ANXA1 por β-actina. Resultados exibidos como média ± erro padrão da média de um experimento realizado em triplicata. *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle.

Em sequência, verificou-se que células BV2 que haviam sido transfectadas com plasmídeos contendo uma sequência *anti-sense* para ANXA1 (resultando em redução da expressão da mesma), em comparação com células inalteradas, apresentaram naturalmente reduzida expressão proteica de PPARγ, na ausência de qualquer tratamento, como verificado por *Western Blotting*. Quando tais células foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 minutos, verificou-se uma reversão da redução da expressão de PPARγ promovida pela reduzida quantidade de ANXA1 intracelular, fazendo com que os níveis de expressão proteica de PPARγ retornassem para níveis similares aos observados para células BV2 não transfectadas (Fig. 7).

Fig. 7. Expressão proteica de PPAR γ por células BV2 transfectadas após tratamento com rANXA1. Células BV2 transfectadas com plasmídeo contendo sequência *anti-sense* para ANXA1 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 min e avaliadas quanto a expressão proteica de PPAR γ por *Western Blotting*. Resultados mostrados como razão da expressão de PPAR γ por β -actina. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

6.2. Efeito da ANXA1 exógena e endógena sobre a expressão gênica de PPAR γ

Material genético (RNA) de células BV2 não tratadas em quantidades de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 ou 30,0 ng foi testado com *primers* para os genes PPAR γ e 18S em concentrações 200, 400 e 600 nM. A observação da *melt curve* de melhor eficiência determinou em quais condições RT-PCR seria realizado da melhor forma (Figs. 8A e 8B). Dentre as possíveis combinações de quantidade de material genético e concentração de *primers*, foi estabelecido que para as melhores condições de análise para o gene PPAR γ são necessários 200 nM de *primers* e 1 ng de material genético e, para o gene 18S, são requeridos 600 nM de *primers* e 1 ng de material genético.

Fig. 8. RT-PCR por análise de *melt curve*. A imagem A mostra a *melt curve* correspondente ao gene PPAR γ nas melhores condições encontradas. A imagem B mostra a *melt curve* correspondente ao gene 18S nas melhores condições encontradas.

Para se avaliar se a ANXA1 exógena poderia modular a expressão gênica de PPAR γ , células BV2 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 30 ou 60 minutos e a transcrição de mRNA correspondente a PPAR γ após tratamentos foi avaliada via RT-PCR. Observou-se modulação da expressão gênica de PPAR γ pela ANXA1, e tal efeito é dependente do tempo de tratamento com rANXA1, uma vez que redução e aumento das expressões de PPAR γ foram observados com tratamento em tempos de 30 e 60 minutos, respectivamente (Figs. 9A e 9B).

Fig. 9. Expressão gênica de PPAR γ por células BV2 após tratamento com rANXA1. Células BV2 tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 30 min (A) e 60 min (B) foram avaliadas quanto a expressão de PPAR γ por RT-PCR. Resultados mostrados como derivação matemática de 2-delta-delta CT. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos realizados em sextuplicata. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Adicionalmente, demonstrou-se que a ANXA1 endógena também modula a expressão gênica de PPAR γ , uma vez que células BV2 transfectadas com plasmídeo contendo sequência *anti-sense* para ANXA1 apresentaram redução da expressão gênica de PPAR γ em comparação com células BV2 inalteradas. Quando as mesmas células transfectadas foram tratadas com rANXA1, em concentração de 100 nM por 60 minutos, verificou-se reversão da expressão de PPAR γ para níveis de expressão gênica próximos aos observados para células inalteradas (Fig. 10).

Fig. 10. Expressão gênica de PPAR γ por células BV2 transfectadas após tratamento com rANXA1. Células BV2 transfectadas com plasmídeo contendo sequência *anti-sense* para ANXA1 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 min e avaliadas quanto a expressão gênica de PPAR γ por RT-PCR. Resultados mostrados como derivação matemática de 2-delta-delta CT. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos realizados em sextuplicatas. ***p<0,001 em comparação com o grupo controle.

6.3. Vias de transcrição envolvidas com controle da ANXA1 sobre a expressão de PPAR γ

Os processos de transcrição envolvidos com a síntese de PPAR γ ainda não são bem esclarecidos e não existem relatos sobre o funcionamento da transcrição existente em células da glia. Desta forma, buscou-se avaliar a expressão de dois fatores de transcrição, sendo um envolvido com a mediação de ações de ANXA1 e outro com a síntese de PPAR γ .

Inicialmente, células BV2 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por um período de 60 minutos; em seguida, foi verificada a expressão proteica de STAT6 por *Western Blotting*. Os dados obtidos mostraram que o tratamento

com rANXA1 não gerou qualquer modificação na expressão proteica de STAT6 (Fig. 11A).

Fig. 11. Expressão proteica de STAT6 por células BV2 transfectadas e não-transfectadas após tratamento com rANXA1. Células BV2 não transfectadas (A) e transfectadas com plasmídeo contendo sequência *anti-sense* para ANXA1 (B) tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 min foram avaliadas quanto a expressão proteica de STAT6 por *Western Blotting*. Resultados mostrados como razão da expressão de STAT6 por β -actina. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos realizados em quadruplicatas. *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle.

Em segundo momento, células BV2 transfectadas com plasmídeo contendo sequência *anti-sense* para ANXA1 foram também tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 minutos e a expressão proteica de STAT6 foi verificada. Constatou-se que células BV2, quando transfectadas com um plasmídeo que promove a redução da expressão de ANXA1, apresentaram expressão proteica de STAT6 total reduzida, mas tal efeito não foi revertido quando as células transfectadas foram tratadas com rANXA1 (Fig. 11B).

Células BV2 assim tratadas foram também avaliadas quanto a expressão de CREB. Células BV2 não-transfectadas e transfectadas com plasmídeo contendo sequência *anti-sense* para ANXA1 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 minutos e a expressão proteica de CREB foi avaliada. Verificou-se que, tanto em células BV2 transfectadas quanto em não-transfectadas, mediante tratamento com rANXA1, não há modificação da expressão proteica de CREB. Contudo, células

BV2 transfectadas apresentaram naturalmente reduzida expressão de CREB total. Assim como verificado para STAT6, tal efeito não foi revertido quando as células transfectadas foram tratadas com rANXA1 (Fig. 12).

Fig. 12. Expressão proteica de CREB por células BV2 transfectadas e não-transfectadas após tratamento com rANXA1. Células BV2 transfectadas com plasmídeo contendo sequência *anti-sense* para ANXA1 ou não-transfectadas foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 min e avaliadas quanto a expressão proteica de CREB por *Western Blotting*. Resultados mostrados como razão da expressão de CREB por Akt. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de um experimento realizado em triplicatas. *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle.

6.4. Efeitos da interação ANXA1/PPAR γ sobre a fagocitose de células apoptóticas

Decidiu-se induzir células PC12 à apoptose por deprivação de soro fetal bovino em seu meio de cultura. As células PC12 exibiram diferentes percentuais de viabilidade, conforme concentração de soro e tempo de deprivação (Figs. 13 e 14). A deprivação das células PC12 de soro fetal bovino causou redução de sua viabilidade, sendo observadas reduções significativas em células incubadas com 0% ou 0,1% de soro fetal bovino (Figs. 13 e 14). Em condições de deprivação de soro por 24 h, a viabilidade celular foi reduzida a 40% e, ainda que a taxa de apoptose não tenha sido variável, a deprivação de soro aumentou a taxa de apoptose tardia à cerca de 30%, sem diferença entre as concentrações de 0 e 0,1% de soro (Fig. 13).

Fig. 13. Determinação de viabilidade de células PC12 mediante deprivação de soro por 24 h. O gráfico A representa a viabilidade celular, o gráfico B representa a quantidade de células que entraram em apoptose, o gráfico C representa a quantidade de células em apoptose tardia e o gráfico D representa a quantidade de células em processo necrótico; todas as quantidades são mostradas em porcentual. Resultados exibidos representam a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicatas. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com respectivos controles.

Em outro grupo experimental onde mantiveram-se as mesmas concentrações de soro no meio de cultura citadas acima, mas onde o tempo de deprivação de soro passou a ser de 48 h, a viabilidade celular foi reduzida mais acentuadamente, chegando a 20%, enquanto as taxas de apoptose tardia chegaram a quase 40%, sem diferenças entre as concentrações de soro de 0 ou 0,1% (Fig. 14). Com base nestes resultados, determinou-se que manter as células PC12 em meio de cultura sem qualquer quantidade de soro fetal bovino por 48 h induz as células à apoptose de forma mais eficiente.

Fig. 14. Determinação de viabilidade de células PC12 mediante deprivação de soro por 48 h. O gráfico A representa a viabilidade celular, o gráfico B representa a quantidade de células que entraram em apoptose, o gráfico C representa a quantidade de células em apoptose tardia e o gráfico D representa a quantidade de células em processo necrótico; todas as quantidades são mostradas em porcentual. Resultados exibidos representam a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicatas. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com respectivos controles.

Subsequentemente, as células PC12 apoptóticas foram cultivadas em associação com células BV2 já aderidas para determinação de fagocitose por diferentes períodos de tempo (Fig. 15). Por um período de tempo de apenas 30 minutos, a taxa de fagocitose foi superior a 5% tanto para células não induzidas como induzidas à apoptose (Fig. 15A). Quando o tempo de co-cultura foi aumentado para 60 minutos, a taxa de fagocitose estendeu-se para mais de 20%, no caso das células PC12 mantidas em condições normais de cultura antes do teste de fagocitose, e para mais de 30%, no caso de células PC12 induzidas à apoptose antes do teste de fagocitose (Fig. 15B). Assim, determinou-se que manter as células PC12 previamente induzidas à apoptose em co-cultura com células BV2 por um período de 60 minutos corresponde a condições suficientes para realização de teste de fagocitose.

Fig. 15. Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 em diferentes tempos. O gráfico A representa o percentual de fagocitose em 30 min de co-cultura; o gráfico B representa o percentual de fagocitose em 60 min de co-cultura. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos realizados em quadruplicatas. * $p < 0,05$ em comparação entre os dois grupos.

Células BV2 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 120 minutos, lavadas com PBS e depois foram mantidas em co-cultura com células PC12 em apoptose por 60 minutos; o percentual de fagocitose foi determinado por citometria de fluxo. Nestas condições, verificou-se que a fagocitose de células PC12 por células BV2 não foi alterada de forma significativa mediante tratamento com rANXA1 (Fig. 16).

Fig. 16. Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 após tratamento com rANXA1. Células BV2 tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 120 min foram mantidas em co-cultura com células PC12 previamente induzidas à apoptose. Os resultados são mostrados como percentual de fagocitose. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos realizados em quadruplicatas.

Em seguida, células BV2 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 120 minutos, lavadas com PBS, posteriormente tratadas com pioglitazona em concentração de 10 μ M por 120 minutos e novamente lavadas com PBS antes de serem mantidas em contato com células PC12 apoptóticas. Nestas condições, verificou-se que as células tratadas com pioglitazona fagocitaram mais células em comparação com o controle, mas esta diferença não se alterou quando as células foram tratadas previamente com rANXA1 (Fig. 17).

Fig. 17. Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 após tratamento com rANXA1 e pioglitazona. Células BV2 tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 120 min e posteriormente com pioglitazona em concentração de 10 μ M por 120 minutos foram mantidas em co-cultura com células PC12 previamente induzidas à apoptose. Os resultados são mostrados como porcentual de fagocitose. Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos realizados em quadruplicatas. * $p < 0,05$ em comparação com respectivos controles.

Em outro momento, sob diferente protocolo experimental, células BV2 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por um período de 60 minutos simultaneamente com GW9662 (antagonista específico de PPAR γ) em concentração de 50 μ M por um período de tempo de 90 minutos. As células assim tratadas foram

mantidas em contato com células PC12 apoptóticas por 60 minutos para realização de fagocitose, sem qualquer lavagem com PBS entre tratamentos ou antes da realização da co-cultura. Verificou-se que as células BV2 tratadas com rANXA1 fagocitaram mais células PC12 apoptóticas do que células BV2 não tratadas; contudo, tal efeito foi revertido quando as células foram tratadas simultaneamente com rANXA1 e GW9662 (Fig. 18).

Fig. 18. Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 após tratamento com rANXA1 e GW9662. Células BV2 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 min e GW9662 em concentração de 50 μ M por 90 min e mantidas em contato com células PC12 apoptóticas para realização de fagocitose. Resultados mostrados como percentual de fagocitose (%). Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicatas. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle; # em comparação com o grupo tratado com rANXA1.

Células BV2 transfectadas com plasmídeo contendo sequência anti-sense para ANXA1 foram tratadas também com ANXA1 exógena e com GW9662, nas mesmas condições descritas no parágrafo anterior. Constatou-se que o tratamento com rANXA1 não provocou qualquer alteração sobre a capacidade fagocítica das células BV2 quando em contato com células PC12 apoptóticas (Fig. 19), ao contrário do verificado para células não transfectadas (Fig. 18).

Fig. 19. Determinação de taxa de fagocitose de células PC12 por células BV2 transfectadas após tratamento com rANXA1 e GW9662. Células BV2 transfectadas com plasmídeo contendo sequência anti-sense para ANXA1 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 min e GW9662 em concentração de 50 μ M por 90 min e mantidas em contato com células PC12 apoptóticas para realização de fagocitose. Resultados mostrados como percentual de fagocitose (%). Resultados exibidos como média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicatas.

6.5. Efeito da interação ANXA1/PPAR γ sobre a expressão de CD36

Tem sido evidenciado na literatura científica que a fagocitose de células apoptóticas e de colesterol por macrófagos e macrófagos *foam* é mediada pela expressão de CD36. Assim, investigamos a expressão deste cluster com o intuito de avaliar sua participação na fagocitose de PC12 apoptóticos por células BV2 e se a ANXA1 *per se* ou via PPAR γ poderia controlar a expressão de CD36.

Desta forma, células BV2 tanto inalteradas geneticamente quanto transfectadas com plasmídeo contendo sequência anti-sense para ANXA1 foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 minutos. Após tratamentos, as células foram coletadas e marcadas com anti-CD36-PE por um período de 30 minutos. A expressão de CD36 foi avaliada por citometria de fluxo e determinada pela mediana da intensidade de fluorescência. Nas condições de tratamento com rANXA1, verificou-se que a expressão de CD36 por células BV2 aumentou de forma sutil, mas

significativa, em comparação com o respectivo controle, tanto quando observam-se células transfectadas quanto não transfectadas. Além disso, a expressão de CD36 por células BV2 transfectadas foi bastante reduzida em comparação com células BV2 inalteradas (Fig. 20)

Fig. 20. Determinação da expressão de CD36 por células BV2 após tratamento com rANXA1. Células BV2 tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 minutos foram marcadas com anti-CD36-PE e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média da intensidade de fluorescência de dois experimentos realizados em triplicatas. * $p < 0,05$ entre os grupos comparados, *** $p < 0,001$ entre os grupos comparados.

Em segundo momento, células BV2, transfectadas ou não, foram tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 minutos, da mesma forma como descrito no parágrafo anterior, lavadas com PBS, e então mantidas em co-cultura com células PC12 apoptóticas por um período de tempo de 60 minutos após tratamento para que houvesse fagocitose. Ao final do período de fagocitose, as células foram coletadas e marcadas com anti-CD36-PE por 30 minutos. A intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram similares ao descrito no parágrafo anterior, onde o tratamento com rANXA1 causou pequeno aumento da expressão de CD36, tanto em células transfectadas quanto em células não transfectadas. Da mesma forma, a expressão de CD36 por células BV2 transfectadas

foi bastante reduzida em comparação com a expressão do receptor por células BV2 inalteradas (Fig. 21)

Fig. 21. Determinação da expressão de CD36 por células BV2 após tratamento com rANXA1 e realização de fagocitose. Células BV2 tratadas com rANXA1 em concentração de 100 nM por 60 minutos e mantidas em contato com células PC12 apoptóticas foram marcadas com anti-CD36-PE e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média da intensidade de fluorescência de três experimentos realizados em quadruplicatas. * $p < 0,05$ entre os grupos comparados, *** $p < 0,001$ entre os grupos comparados.

7. DISCUSSÃO

A relação existente entre PPAR γ e ANXA1 para promoção de efeitos anti-inflamatórios não havia ainda sido descrita em células de microglia. O presente trabalho demonstrou que ANXA1 exógena e endógena modulam a expressão gênica e proteica de PPAR γ , e que a interação entre estes fatores é importante para a fagocitose de neurônios apoptóticos.

Duas abordagens experimentais, tratamento com a proteína recombinante e silenciamento genético, foram empregadas em células de linhagem BV2 para avaliar

o papel terapêutico e da modulação endógena exercida pela ANXA1. A linhagem de células BV2 tem sido muito empregada para estudos de neuroinflamação (LI et al., 2016; ZHOU et al., 2016), e tais células expressam constitutivamente ANXA1 e PPAR γ (MCARTHUR et al., 2010; SONG et al., 2016).

Inicialmente, os resultados obtidos mostraram que o tratamento com rANXA1 aumentou a expressão proteica de PPAR γ significativamente em concentração de 100 nM, a maior concentração utilizada. A literatura científica acerca do emprego de rANXA1 é ampla e mostra grande variabilidade de concentrações de acordo com o tipo celular e efeito obtido. Por exemplo, a produção de hormônio adrenocorticotrófico por células da pituitária é inibida com 5 μ M de rANXA1, enquanto a proliferação de macrófagos inflamatórios é reduzida com 100 nM de rANXA1 (JOHN et al., 2007; XU et al., 2009). Dessa forma, fez-se importante obtermos a melhor concentração e tempo de ação de rANXA1 sobre a expressão de PPAR γ para a continuidade do trabalho.

A literatura científica mostra que tratamento de células da microglia com ligantes de PPAR γ aumenta a expressão proteica de PPAR γ (BERNARDO et al., 2000; FANG et al., 2015). Desta forma, decidimos avaliar o papel da rANXA1 sobre a expressão de PPAR γ na vigência de tratamento com pioglitazona, um ligante específico do receptor (ICHIKAWA et al., 2002). O tratamento com a pioglitazona, em nosso modelo experimental, por tempo menor que o realizado pelos demais estudos (BERNARDO et al., 2000; FANG et al., 2015) reduziu a expressão de PPAR γ , o qual foi revertido pelo tratamento com rANXA1, reforçando a ação da rANXA1 sobre a expressão de PPAR γ . No entanto, vale aqui ressaltar que o veículo da pioglitazona, DMSO a 0,03%, também reduziu a expressão de PPAR γ . Desta forma, não se pode inferir que o a redução da expressão de PPAR γ seja decorrente da ativação do receptor, e este dado necessita de confirmação adicional.

Uma vez mostrado que a rANXA1 induz a expressão de PPAR γ , hipotetizamos que a ANXA1 secretada constitutivamente pela microglia poderia ter papel no controle da expressão de PPAR γ . Da mesma forma que os efeitos anti-inflamatórios desencadeados pela rANXA1, os efeitos da ANXA1 secretada são dependentes de fosforilação extracelular, de presença de cálcio, e de ligação ao receptor FPR, em especial FPR2 (D'ACQUISTO et al., 2008; PERRETTI &

D'ACQUISTO, 2009). Desta forma, foi realizada a transfecção de células BV2 com plasmídeos contendo fragmentos *sense* e *anti-sense* do gene que codifica a proteína ANXA1, conforme descrito por Solito et al. (1998). Tivemos sucesso somente com a transfecção com plasmídeo com sequência *anti-sense*, com redução de cerca de 50% da expressão de ANXA1, o que foi muito superior a transfecção relatada por McArthur et al. (2010), que foi de apenas 14%. A inibição por nós obtida nos deu segurança para continuarmos o trabalho, uma vez que a inibição de 14% de ANXA1 foi descrita como suficiente para inibir a fagocitose de neurônios apoptóticos por células BV2 (MCARTHUR et al., 2010). De fato, nossos resultados mostraram que a redução da expressão de ANXA1 reduz significativamente a expressão proteica de PPAR γ . Vale ressaltar que este dado confirma dados prévios obtidos em nosso laboratório, onde a expressão de PPAR γ em macrófagos peritoneais de camundongos obtidos de animais nocautes para ANXA1 é reduzida (SANTIN, 2013). Ademais, a redução da expressão proteica de PPAR γ foi revertida pelo tratamento de células BV2 transfectadas com rANXA1.

Em conjunto, tais resultados mostram que PPAR γ é um agente modulado a partir das ações *downstream* da ANXA1, o que sugere que a expressão de PPAR γ seja um mecanismo anti-inflamatório da ANXA1, já que esta inibe o desenvolvimento da resposta inflamatória e induz sua resolução (NUCCIO et al., 2015; MAGGIOLI et al., 2016).

É sabido que a ANXA1 é uma importante proteína anti-inflamatória, e, como já salientado, seus efeitos são decorrentes da ativação *downstream* após interação da ANXA1 com os receptores de peptídeo formilado (FPR), em especial com o FPR2 (PERRETI & D'ACQUISTO, 2009). No entanto, não se conhecem todos os eventos moleculares *downstream* após interação da ANXA1 com FPR, especialmente no SNC. Há evidências de que a ANXA1 intracelular pode, por si só, promover motilidade de células pancreáticas cancerosas (BELVEDERE et al., 2014, 2016). Assim, nossos próximos experimentos visaram bloquear FPR2 farmacologicamente e avaliar a expressão de PPAR γ em células BV2.

Os mecanismos envolvidos com a expressão de PPAR γ não são bem conhecidos, e, neste trabalho, demonstramos que a ANXA1 medeia a expressão gênica

deste receptor, uma vez que os níveis de mRNA para PPAR γ foram aumentados pelo tratamento com rANXA1 e reduzidos em células transfectadas. Vale ressaltar que obtivemos perfis distintos de produção de mRNA para PPAR γ em diferentes tempos de tratamentos com rANXA1, havendo redução e aumento dos níveis de mRNA mediante incubação por 30 ou 60 minutos, respectivamente. Seria esperado aumento de mRNA aos 30 minutos de tratamento, já que a expressão gênica precede a proteica. No entanto, é sabido que existem mecanismos intracelulares pós-transcricionais que modificam a estabilidade de mRNAs ou que inibem o processo de tradução, como a ligação com proteínas inibitórias de RNA, antes mesmo de haver tradução proteica. Vários destes mecanismos pós-transcricionais podem modular a ação de fatores inflamatórios, especialmente citocinas (TAKEUCHI, 2016). De fato, ligantes de PPAR γ são capazes de modular a expressão de fatores envolvidos com processos apoptóticos, sem modificar a expressão de qualquer mRNA envolvido com tais processos (RADHAKRISHNAM & GARTEL, 2005). Outros fatores, como mTOR e Map4k4, são capazes de modificar a expressão proteica de PPAR γ em adipócitos sem modificar sua expressão gênica (GUNTUR et al., 2010), enquanto o tratamento de células de microglia e de astrócitos com hormônio estimulante de melanócito aumenta a expressão proteica de PPAR γ sem alterar sua expressão gênica (CARNIGLIA et al., 2013). Em ambos os estudos, sugere-se o envolvimento de mecanismos pós-traducionais que podem afetar a eficiência transcricional ou estabilidade de proteínas (CARNIGLIA et al., 2013; GUNTUR et al., 2010). Desta forma estudos adicionais ainda são necessários para elucidar completamente a modulação da ANXA1 sobre a expressão de PPAR γ .

Há evidências claras de que a interação da ANXA1 com FPR2 induz mobilização de cálcio intracelular e aumento da fosforilação de quinases reguladas por sinais extra-celulares (ERKs) (BENA et al., 2012). Ainda, outros estudos evidenciam que a fosforilação transiente de ERKs em adipócitos é essencial para ativação e aumento da expressão de PPAR γ , o que fornece embasamento para uma possível conexão mecanística entre ANXA1, ERKs e PPAR γ na microglia (BENA et al., 2012; PRUSTY et al., 2002). No entanto, outros fatores de transcrição, como STAT6 e CREB, são importantes intermediários de respostas anti-inflamatórias. Ambos são capazes de influenciar a expressão e ativação de PPAR γ , e CREB já foi descrito como sendo

modulado pelas ações da ANXA1, o que também sugere que tanto STAT6 como CREB podem também ser fatores intermediários que realizam um *link* entre PPAR γ e ANXA1, além das ERKs (CHAWLA, 2010; MAKELA et al., 2016). Nosso grupo de pesquisa já evidenciou em trabalhos anteriores que, em macrófagos periféricos, a expressão proteica de CREB e STAT6 pode ser alterada pelo tratamento com rANXA1, o que torna tais fatores promissores como responsáveis pelo estabelecimento da modulação da ANXA1 sobre a expressão de PPAR γ (SANTIN, 2013).

Atuando como um fator de transcrição, STAT6 é ativado mediante ação de citocinas anti-inflamatórias, especialmente IL-4 e IL-13, desloca-se ao núcleo celular e promove regulação da expressão de outros fatores também de caráter anti-inflamatório, como o PPAR γ (CHAWLA, 2010). Não há informações na literatura científica descrevendo alguma ligação entre ANXA1 e STAT6, mas alguns estudos reportam que ANXA1 modula efeitos anti-inflamatórios em células apoptóticas via FPR2, reduzindo a sinalização pró-inflamatória mediada por STAT3 e bloqueando fatores pró-inflamatórios *downstream*, como SOCS3 (PUPJALIS et al., 2011). Os resultados aqui apresentados mostram redução acentuada da expressão de STAT6 em células BV2 transfectadas, a qual não foi revertida pela ação da rANXA1. Ademais, o tratamento com rANXA1 em células BV2 normais também não induziu a expressão de STAT6. Desta forma, ainda não é possível correlacionar a deficiência de STAT6 com a redução de PPAR γ , mas é importante salientar a redução acentuada de STAT6 vista em células transfectadas.

O CREB, um fator de transcrição, é ativado principalmente pela ligação com cAMP, produzido mediante ação de alguma molécula ativadora de proteínas G, como um neurotransmissor ou um hormônio. A ativação de CREB desencadeia sua migração para o núcleo, dimerização, e ligação ao DNA em regiões chamadas CRE (*cAMP response element*), culminando com a regulação da transcrição gênica de diferentes genes (SHAYWITZ & GREENBERG, 1999). Ainda que envolvido com diversos eventos metabólicos, como controle hormonal e desenvolvimento neurológico, quando ativado, CREB modula também vários fatores *downstream* que promovem a resolução do processo inflamatório, atenuando principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio (THORNTON et al., 2015; ZHAO et al., 2016). Ademais, a ativação

de PPAR γ por CREB promove suas já descritas ações anti-inflamatórias, ainda que os mecanismos exatos pelos qual tal ativação ocorre ainda não estejam claros (HERZIG et al., 2003). Estudos presentes na literatura evidenciam a ligação entre CREB e ANXA1; a região gênica que codifica a proteína ANXA1 contém uma região CRE, que, quando ativada, promove efeitos anti-inflamatórios, e, em linfócitos T e em células de coriocarcinoma tratados com estradiol ou dexametasona, ocorre indução da ativação de ANXA1 juntamente com ativação de CREB, a qual é inibida mediante tratamento com inibidores de cAMP (ANTONICELLI et al., 2001; CALDAS et al., 2003). Com base nestes estudos, investigamos os níveis de CREB sob ação da ANXA1 e, da mesma forma como observado para STAT6, detectamos redução acentuada de CREB em células BV2 transfectadas, a qual não foi revertida pelo tratamento com rANXA1; além disso, rANXA1 também não alterou a expressão de CREB em células BV2 normais.

Associados, os resultados obtidos mostram até então que a deficiência endógena de ANXA1 reduz os níveis de STAT6 e CREB; contudo, não é possível afirmar se estes fatores de transcrição estão envolvidos com a modulação da expressão gênica de PPAR γ . No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar esta hipótese, uma vez que: 1) o eixo STAT6-PPAR γ íntegro é essencial para ativação do fenótipo M2 em macrófagos (ODEGAARD et al., 2007); 2) agonistas de PPAR γ aumentam sua própria expressão via CREB, promovendo efeitos anti-inflamatórios neuroprotetores em modelos de isquemia induzida em murinos (CHIANG et al., 2016); 3) PPAR γ não possui um domínio CRE, apesar de ser modulável por CREB, o que indica que suas ações são mediadas por CREB por meio de outros mecanismos ainda não elucidados (HERZIG et al., 2003). Ainda, como já salientado anteriormente, ANXA1 endógena pode desencadear efeitos intracelularmente. Desta forma, é possível que a ANXA1 endógena não necessite ser secretada e fosforilada para modular STAT6 e CREB.

Ainda que tenha sido constatada uma interação entre ANXA1 e PPAR γ , é importante que se demonstre se tal interação implica em algum efeito biológico de caráter anti-inflamatório. Assim, estudamos os efeitos sobre a fagocitose de neurônios apoptóticos, visto o papel de ambos, ANXA1 e PPAR γ , neste efeito (MCARTHUR et al., 2010; ZHAO et al., 2007). Antes, contudo, fez-se necessário determinar as melhores

condições para realização de fagocitose. Inicialmente, verificou-se em quais condições células PC12 entrariam em apoptose para posterior fagocitose. Tentativas anteriores foram realizadas com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma neurotoxina comumente utilizada para tal propósito (CHENG et al., 2007; GAO et al., 2015). No entanto, dificuldades técnicas inviabilizaram a execução do método e decidiu-se pela deprivação de soro fetal bovino do meio de cultura das células como novo método para indução de apoptose. Mantendo-se as células PC12 sob deprivação completa de soro por 48 h, foi possível reduzir a viabilidade das células a pouco mais de 20%, enquanto cerca de 20% das células entraram em apoptose e cerca de 40% entraram em apoptose tardia. Outros autores também reportam que células PC12 mantidas em condições similares de deprivação de soro têm sua viabilidade reduzida a aproximadamente 20% (BAJESTANI et al., 2014; SATOH et al., 1995). Assim, prosseguiu-se com a busca de condições ideais para a fagocitose destas células por células BV2. Após algumas tentativas, foi verificado que co-cultura por 60 minutos acarretou fagocitose de cerca de 20%, o que foi considerado satisfatório com base na literatura científica (BOYANAPALLI et al., 2010; MCARTHUR et al., 2010), uma vez que tais níveis de fagocitose permitiriam que aumento ou redução deste fenômeno mediante outros tratamentos pudessem ser facilmente mensurados.

Células BV2 tratadas com rANXA1 por 120 minutos, um período de tempo de tratamento selecionado com base no período de tempo necessário para expressão proteica de PPAR γ , não fagocitaram células PC12 apoptóticas mais eficientemente quando se compara com células BV2 não tratadas. Outros autores reportam que ANXA1 é liberada por células em apoptose, que por sua vez medeia o processo de fagocitose ao interagir com fagócitos (PERRETI & D'ACQUISTO, 2009). Contudo, os exatos mecanismos, ainda que se admita envolvimento do receptor FPR2, ainda não são completamente elucidados. O fato de que células BV2 tratadas com rANXA1 e subsequentemente lavadas antes da realização de co-cultura mostra que a ANXA1 não promove qualquer alteração intracelular duradoura nas células BV2 que as estimulem a realizar fagocitose de forma mais eficaz. Aparentemente, a presença física da ANXA1 no momento do contato entre células apoptóticas e fagócitos é essencial. De fato, em segundo momento, quando células BV2 foram tratadas com rANXA1 e mantidas em

contato com a proteína recombinante durante todo o tempo de co-cultura, promoveu-se aumento do percentual de fagocitose de células PC12 apoptóticas por células BV2. Tais resultados demonstram que a ANXA1 exógena de fato promove aumento da fagocitose de células apoptóticas, mas sob a importante condição de que a ANXA1 esteja presente fisicamente durante o contato entre fagócitos e células apoptóticas; tal evento é crucial para formar uma “ponte” entre o fagócito e a célula apoptótica pela interação “ANXA1-serina fosforilada-cálcio-FPR2”. Tal efeito, contudo, era esperado, pois já foi descrito, inclusive em níveis similares aos obtidos no presente trabalho, por outros pesquisadores (MCARTHUR et al., 2010).

Quando as células BV2 são tratadas com um agonista de PPAR γ , observa-se um aumento da fagocitose de células PC12 apoptóticas. Tratamento sequencial dos fagócitos com rANXA1 e agonista de PPAR γ (com remoção de rANXA1 e do agonista de PPAR γ antes da realização de co-cultura) não exacerba a fagocitose, mostrando que o efeito decorre unicamente do agonismo de PPAR γ . Como mencionado no parágrafo anterior, a presença de ANXA1 no momento da co-cultura é importante para aumento de fagocitose, enquanto o mesmo não é verdadeiro para um agonista de PPAR γ , capaz de gerar efeito fagocítico mesmo após já ter sido removido do meio contendo células, evidenciando que eventos *downstream* duradouros desencadeados a partir da ativação direta de PPAR γ modulam a fagocitose, enquanto o mesmo não é visto para ANXA1. Tal efeito de aumento de fagocitose modulado por ativação de PPAR γ é descrito por outros autores no SNC e em outros sistemas, mas até então não há relatos sobre envolvimento da ANXA1 no processo fagocítico mediado por PPAR γ (ZHAO et al., 2007; KNETHEN et al., 2013).

Quando células BV2 foram tratadas com rANXA1 e mantidas em contato com a proteína recombinante durante todo o tempo de co-cultura juntamente com GW9662, um antagonista específico de PPAR γ , o aumento do percentual de fagocitose de células PC12 apoptóticas por células BV2 promovido por rANXA1 foi abolido. Ainda que a ANXA1 seja capaz de acentuar o processo fagocítico, era até então desconhecido o fato de que tal efeito é dependente das ações do PPAR γ , uma vez que seu bloqueio abole tal melhora do processo fagocítico. Novamente, não se sabem todos os mecanismos e eventos *downstream* que ocorrem mediante interação da ANXA1 com

seu receptor que possam convergir aos efeitos do PPAR γ , mas especula-se que o aumento da expressão de PPAR γ provocado pela ANXA1 exógena possa aumentar a eficácia de ligantes endógenos de PPAR γ , como a prostaglandina J2 (agonista natural de PPAR γ), acentuando os efeitos da ativação de PPAR γ mediante sua maior expressão. Tal ativação poderia aumentar o processo fagocítico, pois é descrito que tanto a prostaglandina J2 como agonistas farmacológicos de PPAR γ aumentam a fagocitose de células apoptóticas promovida por macrófagos, em especial de neutrófilos e de linfócitos (BOYANAPALLI et al., 2010; KNETHEN et al., 2013). Em teoria, tal aumento da expressão de PPAR γ mediado por ANXA1 que levaria a maior ativação do receptor e consequentemente à maior fagocitose poderia ser considerado um processo rápido e transiente com base nos resultados obtidos, uma vez que o mesmo princípio explicaria um pressuposto aumento da fagocitose mediante tratamento sequencial com rANXA1 e agonista de PPAR γ , mas isto não foi visto, como descrito no parágrafo anterior.

Quando células transfectadas com plasmídio contendo sequência *anti-sense* referente à ANXA1 foram tratadas com rANXA1, contudo, não houve melhora do percentual de fagocitose. Este resultado não confirma outros dados presentes na literatura para células de glia (MCARTHUR et al., 2010; PATEL et al., 2010). Sabe-se que a ANXA1 não só é importante para a realização do processo fagocítico exteriormente ao fagócito, pois sua presença física é importante para estabelecer uma ligação entre fagócito e células apoptóticas, como já mencionado, mas também internamente, pois a ANXA1 endógena promove várias mudanças intracelulares que facilitam o processo de fagocitose, como por exemplo o rearranjo de filamentos de actina que permitem a reorganização do citoesqueleto e mobilização do fagócito para realização de fagocitose (LIM & PERVAIZ, 2007); dessa forma, infere-se que o processo de fagocitose requer tanto que ANXA1 seja secretada, atue como “ponte”, e ainda ative mecanismos intracelulares (CALLAHAN et al., 2003; SCANNEL & MADERNA, 2006). Dessa forma, os dados assim obtidos requerem ainda investigações adicionais para sua confirmação.

Assim como investigou-se STAT6 e CREB como fatores possivelmente relacionados com a modulação de PPAR γ promovida por ANXA1, também se

investigou CD36, uma proteína de superfície modulada pela ação do PPAR γ diretamente ligada ao processo fagocítico, como possível alvo molecular também modulado pelas ações da ANXA1 e como forma secundária de se avaliar o processo de fagocitose (ASADA et al., 2004; MAJAI et al., 2007). Células BV2 inalteradas e transfectadas, quando tratadas com rANXA1, apresentaram aumento dos níveis de CD36 na membrana, ainda que de forma sutil. Interessantemente, células BV2 transfectadas apresentaram níveis bastante reduzidos de CD36, e tal efeito não foi revertido pela ação da rANXA1. A literatura científica descreve que em células primárias de microglia cultivadas *in vitro* e em modelos *in vivo* de doença de Alzheimer, a ativação de PPAR γ invariavelmente leva a aumento da expressão de CD36 com culminação da resolução de processos inflamatórios induzidos experimentalmente, envolvendo maior fagocitose de células apoptóticas e de placas A β -amilóides (BALLESTEROS et al., 2014; SHEEDY et al., 2013; YAMANAKA et al., 2012). Assim, não é inesperado que a ANXA1, devido às suas atividades anti-inflamatórias, e evidenciada neste trabalho como importante para promoção de fagocitose resolutive dependente de PPAR γ , possa também modular positivamente a expressão de CD36. Além disso, assim como PPAR γ , STAT6 e CREB, que têm sua expressão/ativação mediada conforme presença ou ausência de ANXA1, como descrito no presente trabalho, CD36 também está sujeito à forma similar de modulação; ausência de ANXA1 reduz a expressão de CD36 e estímulo com rANXA1 promove a expressão de CD36. São vários e ainda não bem compreendidos todos os fatores intracelulares e de superfície modulados sob ação da ANXA1; CD36 seria, como demonstrado até então, mais um destes fatores (SCANNEL & MADERNA, 2006; SUGIMOTO et al., 2016). É válido mencionar que existe uma lacuna considerável na literatura científica quanto à expressão de CD36 em células de microglia da linhagem BV2 especificamente; os únicos estudos sobre o tópico são de um mesmo grupo de pesquisa e envolvem doenças causadas por *prions*. Estes estudos demonstram que proteínas neurotóxicas de *prion* ativam CD36 em células BV2 e desencadeiam respostas inflamatórias, culminando com o aumento da produção de IL-1 β , TNF α e IL-6. Sendo ANXA1 uma proteína anti-inflamatória e considerando estes outros estudos, poderia até ser plausível assumir que sua ação em células BV2 promovesse redução da expressão de CD36 ao invés de aumento, ainda que tal

proteína de membrana seja classicamente associada com efeitos anti-inflamatórios em células de microglia primária (MAJAI et al., 2007; KOUADIR et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Os resultados demonstrados no presente trabalho, contudo, aparentam demonstrar o contrário: CD36 é positivamente modulado pelas ações da ANXA1, sugerindo que seus efeitos neste tipo celular são muito possivelmente de caráter anti-inflamatório se se assumem os efeitos anti-inflamatórios da ANXA1, tal como ocorre em células de microglia primária.

Assim, foi demonstrado neste trabalho que a ANXA1 modula a expressão de PPAR γ em células da microglia e que a ativação de PPAR γ está envolvida com a fagocitose de células PC12 apoptóticas induzida pela ANXA1. Embora as vias intracelulares implicadas nesta interação não tenham sido elucidadas totalmente, novas hipóteses acerca das ações da ANXA1 foram levantadas. Ademais, foi mostrado que a ANXA1 endógena modula STAT6, CREB e CD36, e que a investigação destes fatores é importante visto a relevância de fatores de transcrição e de moléculas de superfície para os fenômenos biológicos.

8. CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitem concluir que:

- 1) A anexina A1 recombinante exógena e a anexina A1 endógena modulam a expressão de PPAR γ por via transcricional em células BV2;
- 2) Somente a ANXA1 endógena modula os fatores de transcrição CREB e STAT6;
- 3) A ANXA1 promove a fagocitose de células apoptóticas de forma dependente de PPAR γ ;
- 4) Somente a ANXA1 endógena modula a expressão de CD36 por células da glia.

9. REFERÊNCIAS

ANDERS, H. J.; ROMAGNANI, P.; MANTOVANI, A. Pathomechanisms: homeostatic chemokines in health, tissue regeneration, and progressive diseases. **Trends Mol. Med.**, v. 20, p. 154-165, 2014.

- ANTONICELLI, F.; COUPADE, C.; RUSSO-MARIE, F.; GARREC, Y. CREB is involved in mouse annexin A1 regulation by cAMP and glucocorticoids. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 62-69, 2001.
- AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G.L.; METZLER, K.D.; ZYCHLINKSY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 459-489, 2012.
- ASADA, K.; SASAKI, S.; SUDA, T.; CHIDA, K.; NAKAMURA, H. Anti-inflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human alveolar macrophages. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 169, p. 195-200, 2004.
- BABBIN, B.A.; LAUKOETTER, M.G.; NAVA, P.; KOCH, S.; LEE, W.Y.; CAPALDO, C.T.; PEATMAN, E.; SERVERSON, E.A.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M.; PARKOS, C.A.; NUSRAT, A. Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation and repair. **J. Immunol.**, v. 181, p. 5035-5044, 2008.
- BAJESTANI, N. S.; EMAMI, S. A.; ASILI, J.; NAJARAN, Z. T. Anti-apoptotic effect of taxodione on serum/glucose deprivation induced PC12 cells death. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 34, p. 1103-1109, 2014.
- BALLESTEROS, I.; CUARTERO, M.I.; PRADILLO, J.M.; PARRA, J.; RUIZ, A.P.; CORBI, A.; RICOTE, M.; HAMILTON, J.A.; SOBRADO, M.; VIVANCOS, J.; NOMBELA, F.; LIZASOAIN, I.; MORO, M.A. **J. Leukoc. Biol.**, v. 95, p. 587-598, 2014.
- BELVEDERE, R.; BIZZARRO, V.; FORTE, G.; PIAZ, F.D.; PARENTE, L.; PETRELLA, A. Annexin A1 contributes to pancreatic cancer cell phenotype, behaviour and metastatic potential independently of formyl peptide receptor pathway. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 1-14, 2016.
- BELVEDERE, R.; BIZZARRO, V.; POPOLO, A.; PIAZ, F.D.; VASATURO, M.; PICARDI, P.; PARENTE, L.; PETRELLA, A. Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 14, p. 961-976, 2014.
- BENA, S.; BRANCALEONE, V.; WANG, J.M.; PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Annexin A1 interaction with the FPR2/ALX receptor, identification of distinct domains and downstream associated signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 24690-24697, 2012.
- BENSALEM, N.; VENTURA, A.P.; VALLÉE, B.; LIPECKA, J.; TONDELIER, D.; DAVEZAC, N.; DOS SANTOS, A.; PERRETTI, M.; FAJAC, A.; SERMET-GAUDELUS, I.; RENOUIL, M.; LESURE, J.F.; HALGAND, F.; LAPRÉVOTE, O.; EDELMAN, A. Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 4, p. 1591-1601, 2005.
- BERNARDO, A.; LEVI, G.; MINGHETTI, L. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) and its natural ligand 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 2215-2223, 2000.
- BERNARDO, A.; MINGHETTI, L. PPAR γ agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, p. 93-109, 2006.
- BERGER, J. & MOLLER, D. The mechanisms of action of PPARs. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 409-435, 2002.
- BLOCK, M.L.; ZECCA, L.; HONG, J.S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, p. 57-69, 2007.

- BLUME, K.E.; SOEROES, S.; WAIBEL, M.; KEPPELER, H.; WESSELBORG, S.; HERRMANN, M.; SCHULZE-OSTHOFF, KLAUS; LAUBER, K. Cell surface externalization of annexin A1 as a failsafe mechanism preventing inflammatory responses during secondary necrosis. **J. Immunol.**, v. 183, p. 8138-8147, 2009.
- BOCCHINI, V.; MAZZOLA, R.; BARLUZZI, R.; BLASI, E.; SICK, P.; KETTENMANN, H. An immortalized cell line express properties of activated microglial cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 31, p. 616-621, 1992.
- BOUHLEL, M.A.; DERUDAS, B.; RIGAMONTI, E.; DIEVART, R.; BROZEK, J.; HAULON, S.; ZAWADZKI, C.; JUDE, B.; TORPIER, G.; MARX, N.; STAELS, B.; CHINETTI-GBAGUIDI, G. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell Metab.**, v. 6, p. 137-143, 2007.
- BOYANAPALLI, R.F.; FRASCH, S.C.; RICHES, D.W.H.; VANDIVIER, R.W.; HENSON, P.M.; BRATTON, D.L. PPAR γ activation normalizes resolution of acute sterile inflammation in murine chronic granulomatous disease. **Blood**, v. 116, p. 4512-4522, 2010.
- BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C.; DAUÇA, M.; WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β and - γ in the adult rat. **Endocrinol.**, v. 137, p. 354-366, 1996.
- BROWN, G.C.; VILALTA, A.; FRICKER, M. Phagoptosis – cell death by phagocytosis – plays central roles in physiology, host defense and pathology. **Cur. Mol. Med.**, v. 15, p. 1-10, 2015.
- CALDAS, M.C.; MENDES, A.F.; DUARTE, C.B.; LOPES, M.C.F. Dexamethasone-induced and estradiol-induced CREB activation and annexin 1 expression in CCRF-CEM lymphoblastic cells: evidence for the involvement of cAMP and p38 MAPK. **Mediators inflamm.**, v. 12, p. 329-337, 2003.
- CALLAHAN, M.K.; HALLECK, M.S.; KRAHLING, S.; HENDERSON, A.J.; WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R.A. Phosphatidylserine expression and phagocytosis of apoptotic thymocytes during differentiation of monocytic cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, p. 846-856, 2003.
- CARDONA, S. M.; GARCIA, J. A.; CARDONA, A. E. The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation and homeostasis. **Methods Mol. Biol.**, v. 1013, p. 1-16, 2013.
- CARNIGLIA, L.; DURAND, D.; CARUSO, C.; LASAGA, M. Effect of NDP- α -MSH on PPAR γ and - β expression and anti-inflammatory cytokine in rat astrocytes and microglia. **PLOS ONE.**, v. 8, p. 1-11, 2013.
- CARTA, A.R. & PISANU, A. Modulating microglia activity with PPAR γ agonists: a promising therapy for Parkinson's disease? **Neurotox. Res.**, v. 23, p. 112-123, 2013.
- CHAWLA, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. **Circ. Res.**, v. 106, p. 1559-1569, 2010.
- CHENG, B.; YANG, X.; HOU, Z.; LIN, X.; MENG, H.; LI, Z.; LIU, S. D- β -hydroxybutyrate inhibits the apoptosis of PC12 cells induced by 6-OHDA in relation to up-regulating the ratio of Bcl2/Bax mRNA. **Auton. Neurosci.**, v. 134, p. 38-44, 2007.
- CHIANG, M.C.; NICOL, C.J.; CHENG, Y.C.; LIN, K.H.; YEN, C.H.; LIN, C.H. Rosiglitazone activation of PPAR γ -dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. **Neurobiol. Aging.**, v. 40, p. 181-190, 2016.

CHINETTI-GBAGUIDI, G.; BARON, M.; BOUHLEL, M.A.; VANHOUTTE, J.; COPIN, C.; SEBTI, Y.; DERUDAS, B.; MAYI, T.; BORIS, G.; TAILLEUX, A.; HAULON, S.; ZAWADZKI, C.; JUDE, B.; STAELS, B. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR pathways. **Circ. Res.**, v. 108, p. 985-995, 2011.

CONKRIGHT, M.D.; GUZMAN, E.; FLECHNER, L.; SU, A.I.; HOGENESCH, J.B.; MONTMINY, M. Genome-wide analysis of CREB target gene reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. **Mol. Cell.**, v. 11, p. 1101-1108, 2003.

CRISTANTE, E.; MCARTHUR, S.; MAURO, C.; MAGGIOLI, E.; ROMERO, I.A.; ARRIDGE, M.W.; COURAUD, P.O.; TREMOLEDA, J.L.; CHRISTIAN, H.C.; WEKSLER, B.B.; MALASPINA, A.; SOLITO, E. Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain integrity, and its pathological and therapeutic implications. **PNAS**, v. 110, p. 832-841, 2013.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Annexin A1: a pivotal regulator of the innate and adaptative immune systems. **Brit. J. Pharmacol.** v. 155, p. 152-169, 2008.

DALLI, J.; JONES, C.P.; CAVALCANTI, D.M.; FARSKY, S.H.; PERRETTI, M.; RANKIN, S.M. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. **FASEB**, v. 26, p. 387-396, 2012.

DAYNES, R.A. & JONES, D.C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 748-759, 2002.

DWIGHT, Z.; PALAIS, R.; KENT, J.; WITTEWER, C. T. Heterozygote PCR product melting curve prediction. **Hum. Mutat.**, v. 35, p. 278-282, 2014.

EL-NAA, M.M.; EL-REFAEI, M.F.; NASIF, W.A.; ABDULJAWAD, S.H.; EL-BRAIRY, A.I.; EL-READI, MAHMOUD. In-vivo antioxidant and anti-inflammatory activity of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) agonist in animal model of bronchial asthma. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 67, p. 1421-1430, 2015.

ERDMAN, L.K.; COSIO, G.; HELMERS, A.J.; GOWDA, D.C.; GRINSTEIN, S; KAIN, K.C. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. **J. Immunol.**, v. 183, p. 6452-6459, 2009.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREED, P.W.; WESTCOTT, J.Y.; HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 890-898, 1998.

FANG, M.; WEBSTER, T. F.; STAPLETON, H. M. Activation of human peroxisome proliferator-activated nuclear receptor (PPAR γ 1) by semi-volatile compounds (SVOCs) and chemical mixtures in indoor dust. **Environ. Sci. Technol.**, v. 49, p. 10057-10064, 2015.

FEIGE, J.; GELMAN, L.; MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Prog. Lipid Res.**, v. 45, p. 120-159, 2006.

FULLERTON, J.N. & GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, p. 1-10, 2016.

GAO, K.; LIU, M.; CAO, J.; YAO, M.; LU, Y.; LI, J.; ZHU, X.; YANG, Z.; WEN, A. Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on 6-OHDA induced apoptosis in PC12 cells through the ROS-NO pathway. **Molecules**, v. 20, p. 293-308, 2015.

GAVINS, F.N.E.; DALLI, J.; FLOWER, R.J.; GRANGER, D.N.; PERRETTI, M. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. **FASEB J.**, v. 21, p. 1751-1758, 2007.

GAVINS, F.N.E.; HUGHES, E.L.; BUSS, N.A.P.S.; HOLLOWAY, P.M.; GETTING, S.J.; BUCKINGHAM, J.C. Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-FPR2/ALX anti-inflammatory system. **FASEB J.**, v. 26, p. 4977-4989, 2012.

GLEZER, I.; SIMARD, A.R.; RIVEST, S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. **Neuroscience**, v. 147, p. 867-883, 2007.

GRAY, E.; GINTY, M.; KEMP, K.; SCOLDING, N.; WILKINS, A. The PPAR γ agonist pioglitazone protects cortical neurons from inflammatory mediators via improvement in peroxisomal function. **J. Neuroinflamm.**, v. 9, 2012.

GREENE, L.A. & TISCHLER, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 73, p. 2424-2428, 1976.

GOENKA, S. & KAPLAN, M.H. Transcriptional regulation by STAT6. **Immunol. Res.**, v. 50, p. 87-96, 2011.

GUMA, M.; STEPNIAK, D.; SHAKED, H.; SPEHLMANN, M. E.; SHENOUDA, S.; CHEROUTRE, H.; VICENTE-SUAREZ, I.; ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F.; KARIN, M. Constitutive intestinal NF- κ B does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation. **J. Exp. Med.**, v. 208, p. 1889-1900, 2011.

GUNTUR, K.V.P.; GUILHERME, A.; XUE, L.; CHAWLA, A.; CZECH, M.P. Map4k4 negatively regulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ protein translation by suppressing the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in cultured adipocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 6595-6603, 2010.

GURLEY, C.; NICHOLS, J.; LIU, S.; PHULWANI, N.K.; ESEN, N.; KIELIAN, T. Microglia and astrocyte activation by toll-like receptor ligands: modulation by PPAR γ agonists. **PPAR Res.**, v. 2008, 2008.

HAN, J.; HAJJAR, D.P.; TAURAS, J.M.; FENG, J.; GOTTO, A.M.; NICHOLSON, A.C. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 1241-1246, 2000.

HARRIS, S.G. & PHIPPS, R.P. The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1098-1105.

HEADLAND, S.E. & NORLING, L.V. The resolution of inflammation: principles and challenges. **Sem. Immunol.**, v. 27, p. 149-160, 2015.

- HENN, A.; LUND, S.; HEDTJARN, M.; SCHRATTENHOLZ, A.; PORZGEN, P.; LEIST, M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures of for animal experiments examining brain inflammation. **ALTEX**, v. 26, p. 83-94, 2009.
- HERZIG, S.; HEDRICK, S.; MORANTTE, L.; KOO, S.H.; GALIMI, F.; MONTMINY, M. CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR γ . **Nature**, v. 426, p. 190-194, 2003.
- HONG, C. & TONTONNOZ, P. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 18, p. 461-467, 2008.
- HOU, G.; YIN, Y.; HAN, D.; WANG, Q.Y.; KANG, J. Rosiglitazone attenuates the metalloprotease/anti-metalloprotease imbalance in emphysema induced by cigarette smoke: involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF- κ B signaling. **Int. J. Chron Obstruct. Pulmon. Dis.**, v. 10, p. 715-725, 2015.
- ICHIKAWA, H.; NAITO, Y.; TAKAGI, T.; TOMATSURI, N.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T. A specific peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) ligand, pioglitazone, ameliorates gastric mucosal damage induced by ischemia and reperfusion in rats. **Redox Rep.**, v. 7, p. 343-346, 2002.
- ITOH, M.; SUGANAMI, T.; HACHIYA, R.; OGAWA, Y. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. **Int. J. Inflam.**, v. 2011, 2011.
- JANINI, C. & KUMARI, R. PPAR gamma gene – a review. **Diabetol. Metabol. Syndr.**, v. 9, p. 46-50, 2015.
- JOHN, C.D.; SAHNI, V.; MEHET, D.; MORRIS, J.F.; CHRISTIAN, H.C.; PERRETTI, M.; FLOWER, R.J.; SOLITO, E.; BUCKINGHAM, J.C. Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxin and bacterial peptides. **FASEB.**, v. 21, p. 1037-1046, 2007.
- JOSEPH, C.; BUGA, A.M.; VINTILESCU, R.; BALSEANU, A.T.; MOLDOVAN, M.; JUNKER, H.; WALKER, L.; LOTZE, M.; POPA-WAGNER, A. Prolonged gaseous hypothermia prevents the upregulation of phagocytosis- specific protein annexin 1 and causes low-amplitude EEG activity in the aged rat brain after ischemia. **J. Cerebr. Blood F. Met.**, v. 32, p. 1632-1642, 2012.
- KAPADIA, R.; YI, J.H.; VEMUGANTI, R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR γ agonists. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 1813-1826, 2009.
- KNETHEN, A.; SHA, L.K.; KUCHLER, L.; HEEG, A.K.; FUHRMANN, D.; HEIDE, H.; WITTIG, I.; MAIER, T.J.; STEINHILBER, D.; BRÜNE, B. 5-lipoxygenase contributes to PPAR γ activation in macrophages in response to apoptotic cells. **Cell. Signal.**, v. 25, p. 2762-2768, 2013.
- KOTAS, M.E. & MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation and disease susceptibility. **Cell**, v. 160, p. 816-822, 2015.
- KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci.**, v. 19, p. 312-318, 1996.
- KOUADIR, M.; YANG, L.; TAN, R.; SHI, F.; LU, Y.; ZHANG, S.; YIN, X.; ZHOU, X.; ZHAO, D. CD36 participates in PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶-induced activation of microglia. **PLOS ONE**, v. 7, p. 1-10, 2012.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; CONTRAN, R.S. Robbins & Contran Pathologic Basis of Disease. 7 ed. Philadelphia, Elsevier Inc., 2005. 1525 p.

- LAZARO, M.G.; BONEKAMP, N.A.; GALINDO, M.F.; JORDAN, J.; SCHRADER, M. 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp-1 dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, p. 1960-1969, 2008.
- LEE, K.S.; PARK, S.J.; HWANG, P.H.; YI, H.K.; SONG, C.H.; CHAI, O.H.; KIM, J.S.; LEE, M.K.; LEE, Y.C. PPAR γ modulates allergic inflammation through up-regulation of PTEN. **FASEB J.**, v. 19, 2005.
- LI, N.; LIU, B.W.; REN, W.Z.; LIU, J.X.; LI, S.N.; FU, S.P.; ZENG, Y.L.; XU, S.Y.; YAN, X.; GAO, Y.J.; LIU, D.F.; WANG, W. GLP-2 attenuates LPS-induced inflammation in BV-2 cells by inhibiting ERK1/2, JNK1/2 and NF- κ B signaling pathways. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, p. 1-11, 2016.
- LIM, L.H.K. & PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J.**, v. 21, p. 968-975, 2007.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-CT method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MACHADO, I. D.; SANTIN, J. R.; DREWES, C. C.; GIL, C. D.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M.; FARSKY, S. H. P. Alterations in the profile of blood neutrophil membrane receptors caused by *in vivo* adrenocorticotrophic actions. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 207, p. 754-763, 2014.
- MADEIRA, J. M.; SCHINDLER, S.M.; KLEGERIS, A. A new look at auranofin, dextromethorphan and rosiglitazone for reduction of glia-mediated inflammation in neurodegenerative diseases. **Neural Regener. Res.**, v. 10, p. 391-394, 2015.
- MAGGIOLI, E.; MCARTHUR, S.; MAURO, C.; KIESWICH, J.; KUSTERS, D.H.M.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; YAQOOB, M.; SOLITO, E. Estrogen protects blood-brain barrier from inflammation induced disruption and increased lymphocyte trafficking. **Brain Behav. Immun.**, v. 51, p. 212-222, 2016.
- MAJAI, G.; SARANG, Z.; CSOSMÓS, K.; ZAHUCKZY, G.; FÉSÜS, L. PPAR γ -dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 1343-1354, 2007.
- MAKELA, J.; TSELYKH, T.V.; KUKKONEN, J.V.; ERIKSSON, O.; KORHONEN, L.T.; LINDHOLM, D. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) agonist is neuroprotective and stimulates PGC-1 expression and CREB phosphorylation in human dopaminergic neurons. **Neuropharmacol.**, v. 102, p. 266-275, 2016.
- MARTINEZ, A.A.; MORGESE, M.G.; PISANU, A.; MACHEDA, T.; PAQUETTE, M.A.; SEILLIER, A.; CASSANO, T.; CARTA, A.R.; GIUFFRIDA, A. Activation of PPAR gamma receptors reduces levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. **Neurobiol. Dis.**, v. 74, p. 295-304, 2015.
- MCARTHUR, S.; CRISTANTE, E.; PATERNO, M.; CHRISTIAN, H.; RONCAROLI, F.; GILLIES, G.E.; SOLITO, E. Annexin A1: a central player in the anti-inflammatory and neuroprotective role of microglia. **J. Immunol.**, v. 185, p. 6317-6328, 2010.
- MCARTHUR, S.; LOIOLA, R.A.; MAGGIOLI, E.; ERREDE, M.; VIRGINTINO, D.; SOLITO, E. The restorative role of annexin A1 at the blood-brain barrier. **Fluids Barriers CNS**, v. 13, p. 1-15, 2016.
- MENDES, R. E.; KIYOTA, K. A.; MONTEIRO, J.; CASTANHEIRA, M.; ANDRADE, S. S.; GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C. C.; TUFIK, S. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 544-547, 2007.

MIYAKE, K. & KAISHO T. Homeostatic inflammation in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 30, p. 85-90, 2014.

MUKHERJEE, R.; JOW, L.; CROSTON, G.E.; PATERNITI, J.R. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR γ 2 versus PPAR γ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 8071-8076, 1997.

MURPHY, G.J. & HOLDER, J.C. PPAR γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 21, p. 469-474, 2000.

NUCCIO, C.; BERNARDO, A.; CRUCIANI, C.; SIMONE, R.; VISENTIN, S.; MINGHETTI, L. Peroxisome proliferator activated receptor- γ agonists protect oligodendrocyte progenitors against tumor necrosis factor- α -induced damage: effects on mitochondrial functions and differentiation. **Exp. Neurol.**, v. 271, p. 506-514, 2015.

ODEGAARD, J.I.; GONZALEZ, R.R.R. GOFORTH, M.H.; MOREL, C.R.; SUBRAMANIAN, V.; MUKUNDAN, L.; EAGLE, A.R.; VATS, D.; BROMBACHER, F.; FERRANTE, A.W.; CHAWLA, A. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, p. 1116-1120, 2007.

PARK, Y.M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. **Exp. Mol. Med.**, v. 46, p. 1-7, 2014.

PATEL, D.M.; AHMAD, S.F.; WEISS, D.G.; GERKE, V.; KUZNETSOV, S.A. Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. **J. Cell Sci.**, v. 124, p. 578-588, 2010.

PEREZ, M.J. & QUINTANILLA, R.A. Therapeutic actions of the thiazolidinediones in Alzheimer's disease. **PPAR Res.**, v. 2015, 2015.

PERRETTI, M. & D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 62-70, 2009.

PRUSTY, D.; PARK, B.H.; DAVIS, K.E.; FARMER, S.R. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 46226-46232, 2002.

PUPJALIS, D.; GOETSCH, J.; KOTTAS, D.J.; GERKE, V.; RESCHER, U. Annexin A1 released from apoptotic cells act through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signaling, **EMBO Mol. Med.**, v. 3, p. 102-114, 2011.

QIN, C.; FINLAYSON, S.; AL-SHAREA, A.; ROSLI, S.; BLASIO, M.J.; THOMAR, C.J.; KIRIAZIS, H.; YANG, Y.H.; MORAND, E.F.; MURPHY, A.J.; DU, X.J.; GAO, X.; RITCHIE, R.H. Endogenous annexin A1 regulates hematopoietic stem cell mobilization post myocardial infarction in mice *in vivo*. 2016.

RADHAKRISHNAN, S.K. & GARTEI, A.L. The PPAR γ agonist pioglitazone post-transcriptionally induces p21 in PC3 prostate cancer but not in other cell lines. **Cell Cycle**, v. 4, p. 582-584, 2005.

RAJ, A. & OUDENAARDEN, A. Stochastic gene expression and its consequences. **Cell.**, v. 135, p. 216-226, 2008.

RIES, M.; LOIOLA, R.; SHAH, U.N.; GENTLEMAN, S.M.; SOLITO, E.; SASTRE, M. The anti-inflammatory annexin A1 induces the clearance and degradation of the amyloid- β peptide. **J. Neuroinflammation**, v. 13, p. 1-15, 2016.

RYAN, G. B. & MAJNO, G. Acute inflammation, a review. **Am. J. Pathol.**, v. 86, p. 183-276, 1977.

SANTIN, J.R. Efeito do agonista PPAR Lyso-7 sobre a instalação e cicatrização de úlceras gástricas induzidas em camundongos. Tese, 127 f., Universidade de São Paulo, 2013.

SATO, H.; ISHIHARA, S.; KAWASHIMA, K.; MORIYAMA, N.; SUETSUGU, H.; KAZUMORI, H.; OKUYAMA, T.; RUMI, M.A.K.; FUKUDA, R.; NAGASUE, N.; KINOSHITA, Y. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR γ agonists. **Br. J. Cancer**, v. 83, p. 1394-1400, 2000.

SATOH, T.; SAKAI, N.; KUBO, T.; ENOKIDO, Y.; UCHIYAMA, Y.; HATANAKA, H. Flow cytometric analysis of serum deprivation-induced apoptosis of PC12 cells, with special reference to role of *bcl-2*. **Neurosci. Lett.**, v. 201, p. 119-122, 1995.

SAVILL, J. S.; WYLLIE, A. H.; HENSON, J. E.; WALPORT, M.J.; HENSON, P.M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 865-875, 1989.

SAWMYNADEN, P. & PERRETTI, M. Glucocorticoid upregulation of the annexin A1 receptor in leukocytes. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 349, p. 1351-1355, 2006.

SCANNELL, M.; FLANAGAN, M.B.; DESTEFANI, A.; WYNNE, K.J.; CAGNEY, G.; GODSON, C.; MADERNA, P. **J. Immunol.**, v. 178, p. 4595-4605, 2007.

SCANNELL, M. & MADERNA, P. Lipoxins and annexin-1: resolution of inflammation and regulation of phagocytosis of apoptotic cells. **Scientific World J.**, v. 6, p. 1555-1573, 2006.

SCHINTU, N.; FRAU, L.; IBBA, M.; CABONI, P.; GARAU, A.; CARBONI, E.; CARTA, A.R. PPAR γ mediated neuroprotection in a chronic mouse model of Parkinson's disease. **Eur. J. Neurosci.**, v. 29, p. 954-963, 2009.

SCHITENHELM, J.; TRAUTMANN, K.; TABATABAI, G.; HERMANN, C.; MEYERMANN, R.; BESCHORNER, R. Comparative analysis of annexin-1 in neuroepithelial tumors shows altered expression with the grade of malignancy but is not associated with survival. **Modern Pathol.**, v. 22, p. 1600-1611, 2009.

SERHAN, C.N.; BRAIN, S.D.; BUCKLEY, C.D.; GILROY, D.W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L.A.J.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G.; WALLACE, J.L. Resolution of inflammation: state of the art, definition and terms. **FASEB J.**, v. 21, p. 325-332, 2007.

SHAYWITZ, A.J. & GREENBERG, M.E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 821-861, 1999.

SHEEDY, F.J.; GREBE, A.; RAYNER, K.J.; KALANTARI, P.; RAMKHELAWON, B.; CARPENTER, S.B.; BECKER, C.E.; EDIRIWEERA, H.N.; MULLICK, A.E.; GOLENBOCK, D.T.; STUART, L.M.; LATZ, E.; FITZGERALD, K.A.; MOORE, K.J. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. **Nat. Immunol.**, v. 14, p. 812-823, 2013.

SZELES, L.; TOROCSIK, D.; NAGY, L. PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1771, p. 1014-1030, 2007.

SILVA, M.T. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 89, p. 675-683, 2011.

SMITH, H.K.; GIL, C.D.; OLIANI, S.M.; GAVINS, F.N.E. Targeting formyl peptide receptor 2 reduces leukocyte-endothelial interactions in a murine model of stroke. **FASEB**, v. 29, p. 2161-2171, 2015.

SOLITO, E.; KAMAL, A.; MARIE, F.R.; BUCKINGHAM, G.C.; MARULLO, S.; PERRETTI, M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. **FASEB**, v. 17, p. 1544-1546, 2003.

SOLITO, E.; MCARTHUR, S.; CHRISTIAN, H.; GAVINS, F.; BUCKINGHAM, J.C.; GILLIES, G.E. Annexin A1 in the brain – undiscovered roles? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 29, p. 135-142, 2008.

SOLITO, E.; RAGUENES-NICOL, C.; COUPADE, C.; BISAGNI-FAURE, A.; RUSSO-MARIE, F. U937 cells deprived of endogenous annexin A1 demonstrate an increased PLA₂ activity. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 124, p. 1675-1683.

SOLITO, E. & SASTRE, M. Microglia function in Alzheimer's disease. **Front. Pharmacol.**, v. 3, 2012.

SONG, G.J.; NAM, Y.; JO, M.; JUNG, M.; KOO, J.Y.; CHO, W.; KOH, M.; PARK, S.B.; SUK, K. A novel small-molecule agonist of PPAR γ potentiates an anti-inflammatory M2 glial phenotype. **Neuropharmacol.**, 2016.

STANSLEY, B. & HENSLEY, K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. **J. Neuroinflamm.**, v. 9, 2012.

STOLZING, A. & GRUNE, T. Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. **FASEB**, v. 18, p. 743-745, 2004.

STORER, P.D.; XU, J.; CHAVIS, J.; DREW, P.D. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: implications for multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, v. 165, p. 113-122, 2005.

STRAUS, D.S. & GLASS, C.K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 551-558, 2007.

SUGIMOTO, M.A.; VAGO, J.P.; TEIXEIRA, M.M.; SOUSA, S.P. Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis and clearance. **J. Immunol. Res.**, v. 2016, p. 1-14, 2016.

TAKAHAMA, C.H. Controle da anexina 1 sobre a expressão do receptor nuclear proliferador de peroxissomos em diferentes tipos celulares. Dissertação, 104 f., Universidade de São Paulo, 2016.

TAKEUCHI, O. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. **Chronic Inflammation**, *Springer Japan*, p. 319-332, 2016.

THORNTON, C.C.; AL-RASHED, F.; CALAY, D.; BIRDSEY, G.M.; BAUER, A.; MYLROI, H.; MORLEY, B.J.; RANDI, A.M.; HASKARD, D.O.; BOYLE, J.J.; MASON, J.C. Methotrexate-mediated activation of an

AMPK-CREB-dependent pathway: a novel mechanism for vascular protection in chronic systemic inflammation. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 0, p. 1-10, 2015.

TONTONOZ, P. & SPIEGELMAN, B.M. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . **Annu. Rev. Biochem.**, v. 77, p. 289-312, 2008.

VAGO, J.P.; NOGUEIRA, C.R.C.; TAVARES, L.P.; SORIANI, F.M.; LOPES, F.; RUSSO, R.C.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M.; SOUSA, L.P. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 92, p. 249-258, 2012.

WANG, S.; SUN, W.; ZHANG, X.; LI, Z.; WU, M.; ZHAO, W.; WANG, H.; CHEN, T.; YAN, H.; ZHU, J. Wnt1 positively regulates CD36 via TCF4 and PPAR γ in macrophages. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 35, p. 1289-1302, 2015.

WANG, S.; ZHANG, X.; TAN, L. Serum amyloid promotes visfatin expression in macrophages. **Biomed. Res. Int.**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

WANG, Z.; CHEN, Z.; YANG, J.; YANG, Z.; YIN, J.; ZUO, G.; DUAN, X.; SHEN, H.; Li, H.; CHEN, G. Identification of two phosphorylated sites essential for annexin A1 in blood-brain barrier protection after experimental intracerebral hemorrhage in rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 0, p. 1-17, 2016.

WOSTER, A.P. & COMBS, C.K. Differential ability of a thiazolidineone PPAR γ agonist to attenuate cytokine secretion in primary microglia and macrophage-like cells. **J. Neurochem.**, v. 103, p. 67-76, 2007.

WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.J.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, p. 1618-1631, 2010.

XU, L.M.; JIN, S.W.; ZHOU, X.Y.; WU, P.; LI, Y.S.; ZHANG, L.; LIN, Y.Y.; CHEN, Y.; YE, D.Y. Effects of exogenous annexin A1 on lipopolysaccharide-induced proliferation and reactive oxygen species production partially through modulation of CRAC channels but independent of NK-kB pathway. **Inflamm. Res.**, v. 58, p. 921-930, 2009.

YAMANAKA, M.; ISHIKAWA, T.; GRIEP, A.; AXT, D.; KUMMER, M.P.; HENEKA, M.T. PPAR γ /RXR-induced and CD36-mediated microglial amyloid- β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. **J. Neurosci.**, v. 32, p. 17321-17331, 2012.

YANG, Y.H.; TOH, M.L.; CLYNE, C.D.; LEECH, M.; AEERLI, D.; XUE, J.; DACUMOS, A.; SHARMA, L.; MORAND, E.F. Annexin 1 negatively regulates IL-6 expression via effects on p38 MAPK and MAPK phosphatase-1. **J. Immunol.**, v. 177, p. 8148-8153, 2006.

ZHANG, S.; YANG, L.; KOUADIR, M.; TAN, R.; LU, Y.; CHANG, J.; XU, B.; YIN, X.; ZHOU, X.; ZHAO, D. PP2 and piceatannol inhibit PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶-induced iNOS activation mediated by CD36 in BV2 microglia. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 45, p. 763-772, 2013.

ZHANG, Y.; ZHAN, R.X.; CHEN, J.Q.; GAO, Y.; CHEN, L.; KONG, Y.; ZHONG, X.J.; LIU, M.Q.; CHU, J.J.; YAN, G.Q.; Li, T.; HE, M.; HUANG, Q.R. Pharmacological activation of PPAR gamma ameliorates vascular endothelial insulin resistance via a non-canonical PPAR gamma-dependent nuclear factor-kappa B trans-repression pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 754, p. 41-51, 2015.

ZHANG, Z.; HUANG, L.; ZHAO, W. Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-k β and inhibits its activation: anticancer effects *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Res.**, v. 70, p. 2379-2388, 2010.

ZHAO, D.; KWON, S.H.; CHUN, Y.S.; GU, M.Y.; YANG, H.O. Anti-neuroinflammatory effects of fucoxanthin via inhibition of akt/NF-kB and MAPKs/AP-1 pathways and activation of PKA/CREB pathway in lipopolysaccharide-activated BV2 microglial cells. **Neurochem. Res.**, p. 1-11, 2016.

ZHAO, X.; SUN, G.; ZHANG, J.; STRONG, R.; SONG, W.; GONZALES, N.; GROTTA, J.; ARONOWSKI, J. Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: role for peroxisome proliferator-activated receptor γ in microglia/macrophages. **Ann. Neurol.**, v. 61, p. 351-362, 2007.

ZHOU, Y.; WU, Z.; CAO, X.; DING, L.; WEN, Z.; BIAN, J.S. HNO suppresses LPS-induced inflammation in BV-2 microglial cells via inhibition of NF-kB and p38 MAPK pathways. **Pharmacol. Res.**, v. 111, p. 885-895, 2016.

10. ANEXOS

10.1. Informações para os membros da Banca Julgadora de Mestrado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de

Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Presidente da CPG/FCF/USP

10.2. Estratégia de *gating* para determinação de viabilidade celular

Gating representativo para determinação de viabilidade celular. **A.** Gate contendo células PC12. **B.** Seleção em quadrantes de células PC12 do grupo controle para FL2 (iodeto de propídeo) e FL4 (anexinaV-APC). **C.** Seleção em quadrantes de células PC12 induzidas à apoptose para FL2 (iodeto de propídeo) e FL4 (anexinaV-APC).

10.3. Estratégia de *gating* para determinação de fagocitose

Gating representativo para fagocitose. **A.** Gate contendo células BV2. **B.** Seleção vertical de células F4/80-PeCy5 positivas (apenas células BV2 marcadas). **C.** Seleção vertical de células BV2 CFSE positivas a partir de células F4/80-PeCy5 positivas (na imagem, representa-se o controle de fagocitose a partir de células BV2, sem co-cultura com células PC12).

10.4. Membrana representativa de *Western Blotting* para ANXA1

Bandas representativas de ANXA1 (referente à figura 6). 1 – Marcadores de peso molecular; 2 - Controle positivo de ANXA1; 3, 4 – Controle (células BV2 não transfectadas); 5, 6 e 7 – Plasmídio *anti-sense* (células BV2 transfectadas com plasmídio em orientação *anti-sense*); 8, 9 e 10 – Plasmídio *sense* (células BV2 transfectadas com plasmídio em orientação *sense*).

10.5. Membrana representativa de *Western Blotting* para PPAR γ

Bandas representativas de PPAR γ (referente à figura 4). 1 – Marcadores de peso molecular; 2 e 7 – Controle; 3 e 8 – ANXA1 em concentração 0,1 nM; 4 e 9 – ANXA1 em concentração 1 nM; 5 e 10 – ANXA1 em concentração 10 nM; 6 e 11 – ANXA1 em concentração 100 nM.

10.6. Membrana representativa de *Western Blotting* para STAT6

Bandas representativas de STAT6 (referente à figura 11). 1 – Marcadores de peso molecular; 2, 4, 6, 8, 10, 12 - Células BV2 não transfectadas; 3, 5, 7, 9, 11, 13 – Células BV2 não transfectadas + ANXA1 100 nM.

10.7. Membrana representativa de *Western Blotting* para CREB

Bandas representativas de CREB (referente à figura 12). Estes experimentos foram conduzidos por colaboradores, e por conta de tal a apresentação das membranas difere da até então apresentada nos demais itens da seção de anexos. 1, 5, 8 – Células BV2 não transfectadas; 2, 6, 10 – Células BV2 não transfectadas + ANXA1 100 nM; 3, 7, 11 – Células BV2 transfectadas; 4, 8, 12 – Células BV2 transfectadas + ANXA1 100 nM; 13 – Controle positivo. *As bandas numeradas 5, 6, 7 e 8 não foram visualizáveis, e, portanto, não foram inclusas nas análises.

10.8. Representação gráfica da intensidade de fluorescência para CD36

Gráficos representativos da expressão de CD36 (referente à figura 20). Os gráficos mostram a contagem de células marcadas com anti-CD36-PE. A linha no gráfico representa a quantidade de células conforme intensidade de fluorescência. **1** – Células BV2 não transfectadas; **2** – Células BV2 não transfectadas + ANXA1 100 nM; **3** – Células BV2 transfectadas; **4** – Células BV2 transfectadas + ANXA1 100 nM.

10.9. Currículo Lattes

Gustavo Henrique Oliveira da Rocha

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome	Gustavo Henrique Oliveira da Rocha
Filiação	Admir Samolenko da Rocha e Andyara Oliveira da Rocha
Nascimento	03/07/1991 - Londrina/PR - Brasil
Carteira de Identidade	104408222 SSP-PR - PR - 10/10/2005
CPF	068.842.639-54
Passaporte	929062

Formação acadêmica/titulação

2015	Mestrado em Pós-Graduação em Toxicologia, FCFRP-USP. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Título: Influência da anexina A1 sobre a fagocitose e a expressão de PPAR γ em células da microglia Orientador: Sandra Helena Poliselli Farsky Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2009 - 2014	Graduação em Farmácia. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil com período sanduíche em University of Ottawa (Orientador : James Gomes) Título: Exposição de uma população de viticultores a metais pesados devido ao uso de agrotóxicos Orientador: Paula Nishiyama
2006 - 2008	Ensino Médio (2o grau) . Colégio "Nossa Senhora do Rosário", CNSR, Brasil

1998 - 2005 Ensino Fundamental (1o grau) .
Colégio "Nossa Senhora do Rosário", CNSR, Brasil

Formação complementar

2016 - 2016 Treinamento operacional BD Accuri C6. . (Carga horária: 12h).
BD Biosciences, BD, Brasil

2016 - 2016 Curso de curta duração em Basis of ANesthesia and Pain Management in Animal Experimentation. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, SBFTE, Sao Paulo, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em Técnicas para Estudo de Estresse Oxidativo. (Carga horária: 40h).
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil

Curso Elementar em Alemão. .
Instituto de Línguas da UEM, ILG-UEM, Brasil
Ano de interrupção: 2012

2010 - 2010 Curso de curta duração em Farmácia Hospitalar. (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Bioequivalência e Biodisponibilidade. (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Microorganismos: Ferramenta Básica para a Biocatál. (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil

2003 - 2006 First Proficiency Course in English. . (Carga horária: 245h).
Wizard Cornélio Procópio, WIZARD, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2014 - Atual

2. University of Ottawa - U.OTTAWA

Vínculo institucional

2013 - 2013

Áreas de atuação

1. Avaliação e análises toxicológicas

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Rocha, G.H.O.**; STEINBACH, C.; MUNHOZ, J.R.; MADIA, M.A.O.; FARIA, J.K.; HOELTGEBAUM, D.; BARBOSA, F.; BATISTA, B.L.; SOUZA, V.C.O.; NERILO, S.B.; BANDO, E.; MOSSINI, S.A.G.; Nishiyama, P.

Trace metal levels in serum and urine of a population in southern Brazil. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* , v.35, p.61 - 65, 2016.

2. NERILO, SAMUEL B.; **ROCHA, GUSTAVO HENRIQUE O.**; TOMOIKE, CAROLINE; MOSSINI, SIMONE A. G.; GRESPAN, RENATA; MIKCHA, JANE M. G.; MACHINSKI, MIGUEL

Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production by *Zingiber officinale* essential oil in *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Science & Technology (Print).* , v.51, p.n/a - n/a, 2015.

3. KOHIYAMA, CÁSSIA YUMIE; YAMAMOTO RIBEIRO, MILENE MAYUMI; MOSSINI, SIMONE APARECIDA GALERANI; BANDO, ERIKA; BOMFIM, NATÁLIA DA SILVA; NERILO, SAMUEL BOTIÃO; **ROCHA, GUSTAVO HENRIQUE OLIVEIRA**; GRESPAN, RENATA; MIKCHA, JANE MARTHA GRATON; MACHINSKI, MIGUEL

Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry.* , v.173, p.1006 - 1010, 2015.

4. **ROCHA, GUSTAVO HENRIQUE OLIVEIRA**; LINI, RENATA SANO; BARBOSA, FERNANDO; BATISTA, BRUNO LEMOS; DE OLIVEIRA SOUZA, VANESSA CRISTINA; NERILO, SAMUEL BOTIÃO; BANDO, ERIKA; MOSSINI, SIMONE APARECIDA GALERANI; NISHIYAMA, Paula

Exposure to heavy metals due to pesticide use by vineyard farmers. *International Archives of Occupational and Environmental Health.* , v.87, p.1 - , 2014.

5. NERILO, SAMUEL BOTIÃO; MARTINS, FERNANDA ANDRADE; NERILO, LUCIANA BOTIÃO; SALVADEGO, VALTER EDUARDO COCCO; ENDO, RENAN YOSHIO; **ROCHA, GUSTAVO HENRIQUE OLIVEIRA**; MOSSINI, SIMONE APARECIDA GALERANI; JANEIRO, VANDERLY; NISHIYAMA, Paula; MACHINSKI JUNIOR, MIGUEL

Pesticide use and cholinesterase inhibition in small-scale agricultural workers in southern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Impresso).* , v.50, p.783 - 791, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ZAMPIERI, N. S.; **ROCHA, G. H. O.**; KOHIYAMA, C. Y.; NERILO, S.B.; GLORIA, E. M.

Aplicação do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) para controle de deterioração e produção de toxinas pelo *Aspergillus flavus* L. em alimentos In: 23º Encontro Anual de Iniciação Científica, 2014, Londrina.

Anais do 23º Encontro Anual de Iniciação Científica. , 2014.

2. **ROCHA, GUSTAVO HENRIQUE OLIVEIRA**; LINI, R. S.; NERILO, S.B.; OLIVEIRA, A. R.; BARBOSA JR., F.; BATISTA, B. L.; SOUZA, V. C. O.; Nishiyama, P.; MOSSINI, S. A. G.

Copper exposure among vineyard workers due to pesticide use In: V Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica, 2014, Salvador.

Toxicovigilância Toxicologia Clínica. , 2014.

3. ROMOLI, J. C. Z.; **ROCHA, G. H. O.**; KOHIYAMA, C. Y.; MOSSINI, S. A. G.; AMALFI, I. N.;

NAKASUGI, L. P.

Efeito do óleo essencial de *Thymus Vulgaris* L. (Tomilho) na produção de fumosinias pelo *Fusarium Verticillioides* In: 23º Encontro Anual de Iniciação Científica, 2014, Londrina.

Anais do 23º Encontro Anual de Iniciação Científica. , 2014.

4. **ROCHA, G. H. O.**; MACHINSKI JUNIOR, M

Avaliação do efeito do óleo essencial de gengibre em *Aspergillus flavus* L. pela determinação de aflatoxinas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência In: COLACRO XIV, 2012, Florianópolis.

Anais do COLACRO XIV. , 2012.

5. **ROCHA, G. H. O.**; Machinski, M.

Avaliação do potencial inibitório da biossíntese de aflatoxinas por óleo essencial de gengibre In: 21º Encontro Anual de Iniciação Científica, 2012, Maringá.

Anais do 21º Encontro Anual de Iniciação Científica. , 2012.

6. **ROCHA, G. H. O.**; Nishiyama, P.

Comparação dos níveis de glicemia capilar em duas populações distintas In: 10º Fórum de Extensão e Cultura da UEM, 2012, Maringá.

Anais do 10º Fórum de Extensão e Cultura da UEM. , 2012.

7. KOHIYAMA, C. Y.; **ROCHA, G. H. O.**; RIBEIRO, M. M. G. Y.; SILVA, M. V.; TOMOIKE, C.; MOSSINI, S. A. G.; BANDO, E.; FERREIRA, F. D.; Machinski, M.

Determinação de aflatoxinas e ergosterol por cromatografia em fase líquida de alta eficiência para avaliar a ação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L) em *Aspergillus flavus* L. In: COLACRO XIV, 2012, Florianópolis.

Anais do COLACRO XIV. , 2012.

8. AMES, F. Q.; USSUELI, R. C.; **ROCHA, G. H. O.**; Nishiyama, P.

Glicemia capilar em voluntários durante a III e IV corrida rústica de Iguatemi In: 21º Encontro Anual de Iniciação Científica, 2012, Maringá.

Anais do 21º Encontro Anual de Iniciação Científica. , 2012.

9. MELO, G. A. N.; **ROCHA, G. H. O.**; COLOMBELLI JUNIOR, C.; CUMAN, R.K.N.; MACHINSKI JUNIOR, M; SILVA, E.L.; NISHIYAMA, Paula

Avaliação do efeito do anetol e eugenol sobre a atividade da enzima butiril e acetilcolinesterase humana In: XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2011, Ribeirão Preto.

Brazilian Journal of Toxicology. , 2011.

10. CARDOSO, R.F; **ROCHA, G. H. O.**

Otimização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) no Diagnóstico Laboratorial da Hanseníase In: XIII Encontro Maringense de Biologia e XXVI Semana de Biologia, 2011, Maringá.

Anais do XIII Encontro Maringense de Biologia e XXVI Semana de Biologia. , 2011.

11. NERILO, S.B.; Martins, F.A.; **ROCHA, G. H. O.**; Nishiyama, P.; Machinski, M.

Reference values of cholinesterases activity in whole blood and plasma in southern Brazil In: 47th Congress of the European Societies of Toxicology

European Journal of Toxicology. , 2011.

12. NISHIYAMA, Paula; **ROCHA, G. H. O.**; NERILO, S.B.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M

Uso de biomarcadores de avaliação hepática e renal para caracterizar exposição a praguicidas In: XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2011, Ribeirão Preto.

Brazilian Journal of Toxicology. , 2011.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ROCHA, G. H. O.**; MOSSINI, S. A. G.; Nishiyama, P.
Exposure to heavy metals due to pesticide use by grapevine farmers, 2014.
(Simpósio, Apresentação de Trabalho)
2. **ROCHA, G. H. O.**
Ferramentas Básicas de Estatística Aplicadas à Pesquisa Científica, 2014. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
3. **ROCHA, G. H. O.**; MACHINSKI JUNIOR, M.
Avaliação do potencial inibitório da biossíntese de aflatoxinas por óleo essencial de gengibre, 2012. (Outra, Apresentação de Trabalho)
4. **ROCHA, G. H. O.**; RIBEIRO, M. M. G. Y.; TOMOIKE, C.; KOHIYAMA, C. Y.; FERREIRA, F. D.; MOSSINI, S. A. G.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M.
Avaliação do potencial inibitório da biossíntese de aflatoxinas por óleo essencial de gengibre, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
5. **ROCHA, G. H. O.**; USSUELI, R. C.; AMES, F. Q.; NISHIYAMA, Paula
Comparação dos Níveis de Glicemia Capilar em Duas Populações Distintas, 2012.
(Outra, Apresentação de Trabalho)
6. NISHIYAMA, Paula; **ROCHA, G. H. O.**
Uso de Biomarcadores de Avaliação Hepática e Renal para Caracterizar Exposição a Praguicidas, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2016. (Congresso)
Annexin A1 Modulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; Expression In BV2 Murine Microglial Cell Line.
2. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2016. (Congresso)
Translocator Protein 18 kDa (TSPO): A Promising Target for Meta-Inflammation.
3. **V Escola de Inverno em Toxicologia - V EITOX**, 2016. (Seminário)
Alterações Imunológicas e os Fundamentos da Imunidade Inata e Adquirida.
4. **V Escola de Inverno em Toxicologia - V EITOX**, 2016. (Seminário)
Toxicologia In Vitro.
5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas / II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology**, 2016. (Simpósio)
Investigation of The Immunotoxic Mechanisms of PCB-126 on G-Protein Coupled Receptor Activation.
6. Apresentação Oral no(a) **VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas / II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology**, 2016. (Simpósio)
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Expression is Modulated by Annexin A1 in BV2 Cells.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas / II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology**, 2016. (Simpósio)
Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Expression is Modulated by Annexin A1 in BV2 Cells.
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **9th Congress of Toxicology in Developing Countries / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2015. (Congresso)
Exposure to heavy metals due to pesticide use by grapevine farmers.
9. **VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC/ I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology**, 2015. (Simpósio).
10. **III Escola de Inverno em Toxicologia**, 2014. (Simpósio)
Exposure to heavy metals due to pesticide use by grapevine farmers.
11. **XIII Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos e Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2014. (Simpósio).
12. **10º Fórum de Extensão e Cultura - A Extensão Universitária e o Desenvolvimento Regional**, 2012. (Outra)
Comparação dos níveis de glicemia capilar em duas populações distintas.
13. **21º Encontro Anual de Iniciação Científica**, 2012. (Encontro)
Avaliação do potencial inibitório da biossíntese de aflatoxinas por óleo essencial de gengibre.
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas**, 2012. (Congresso)
Avaliação do efeito do óleo essencial de gengibre em *Aspergillus flavus* L. pela determinação de aflatoxinas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência.
15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2011. (Congresso)
Uso de Biomarcadores de Avaliação Hepática e Renal para Caracterizar Exposição a Praguicidas.
16. **I Simpósio de Integração das Disciplinas Básicas e Clínicas da Saúde: Unindo o Conhecimento Científico ao Dia a Dia do Profissional da Saúde**, 2011. (Simpósio).
17. **Bioequivalência e Biodisponibilidade**, 2010. (Outra).
18. **I Congresso Sul Americano de Farmácia**, 2010. (Congresso).
19. **III Corrida Rústica de Iguatemi - Elenilson Silva - Pare de Fumar Correndo**, 2010. (Outra).
20. **O que é o Ato Médico? Relevâncias e aplicações para a Profissão Farmacêutica**, 2010. (Outra).
21. **V Workshop de Biocatálise e Biotransformação**, 2010. (Outra).
22. **Conhecendo a Profissão Farmacêutica**, 2009. (Outra).
23. **IV Semana pela Conscientização sobre a Profissão Farmacêutica**, 2009. (Outra).

Organização de evento

1. COSTA, M. A.; ROCHA, G. H. O.
Capanha 5 de Maio - Uso Racional de Medicamentos, 2012. (Outro, Organização de evento)

2. Nishiyama, P.; **ROCHA, G. H. O.**

Glicemia capilar em trabalhadores rurais de Marialva, 2011. (Outro, Organização de evento)

10.10. Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 9160030/1 - Gustavo Henrique Oliveira da Rocha

Email: gustavohorocha@usp.br
Data de Nascimento: 03/07/1991
Cédula de Identidade: RG - 10.440.822-2 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Estadual de Maringá - Paraná - Brasil - 2014

Curso: Mestrado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 19/02/2015
Início da Contagem de Prazo: 19/02/2015
Data Limite para o Depósito: 21/08/2017
Orientador: Prof(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 19/02/2015 até o presente. Email: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 19/02/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/03/2016
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 19/02/2015
 Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016
Impresso em: 17/12/2016 16:31:56

9141 - 9160030/1 - Gustavo Henrique Oliveira da Rocha

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-3/6	Tópicos Avançados em Toxicologia I	03/03/2015	16/06/2015	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5803-3/5	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	24/03/2015	06/04/2015	30	2	75	A	N	Concluída
SCS5703-2/4	Metodologia e Divulgação do Artigo Científico (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	17/04/2015	31/07/2015	60	4	90	B	N	Concluída
BMI5897-1/4	Resposta Imune Inata e Adaptativa no Sistema Nervoso Central (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	01/06/2015	28/06/2015	60	4	85	A	N	Concluída
FBC5734-3/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5814-6/1	Toxicologia Aplicada aos Alimentos	15/09/2015	05/10/2015	75	5	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/2	Aprimoramento Pedagógico	31/05/2016	27/06/2016	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
 A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016
Impresso em: 17/12/2016 16:31:56