UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e

Análises Toxicológicas

Controle da Anexina 1 sobre a expressão do receptor nuclear proliferador de peroxissomos em diferentes tipos celulares

Carina Harumi Takahama

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

Controle da Anexina 1 sobre a expressão do receptor nuclear proliferador de peroxissomos em diferentes tipos celulares

Carina Harumi Takahama

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção de grau de MESTRE
Orientadora: Profª Drª Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2016

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

Takahama, Carina Harumi
T136c Controle de Anexina 1 sobre a expressão do receptor nuclear proliferador de peroxissomos em diferentes tipos celulares / Carina Harumi Takahama. -- São Paulo, 2016.
104p.

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

Carina Harumi Takahama

Controle da Anexina 1 sobre a expressão do receptor nuclear proliferador de peroxissomos em diferentes tipos celulares

Comissão Julgadora
Da
Dissertação para obtenção de grau de MESTRE

Profª Drª Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientador/presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

São Paulo,_____de_____de_____

À minha família, especialmente minha mãe,

que acreditou em mim desde o começo

e continua acreditando.

If it doesn’t challenge you,

It doesn’t change you.

Scientia est potentia

(Conhecimento é poder)

AGRADECIMENTOS

Quando ingressei no mestrado, todos me disseram que dois anos passariam muito rápido, mas nunca imaginei que passariam voando. Apesar do pouco tempo, dois anos foram suficientes para conhecer muitas pessoas, aprender muito e me transformar. Então quero deixar meu muito obrigada a todos os companheiros de laboratório: Carine Drewes, Lorena Pantaleão, Leonard Devinci Kanda, Cintia Heluany, Gustavo Rocha, Cristina Hebeda, Marina Spatti, Natalia Pereira, Wesley Cruz, Eric Barioni e Paula Gabriela. Cada um me ensinou de uma maneira muito especial sobre pesquisa e sobre a vida.

Não posso deixar de citar minha orientadora, Profa. Dra. Sandra H. Poliselli Farsky, que me ensinou o que é comprometimento. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos e mentores Marcos e Milena (Mel), que sempre estão presentes dando seus mais sinceros palpites. Aprendo muito com vocês. Obrigada por me inspirarem.

À Juliana, Silas, Mariana, Ana, Bárbara, Will, que foram meus companheiros durante uma parte da minha vida de mestranda e me ajudaram a me tornar alguém melhor e desenvolver importantes habilidades para a vida.

Ao meu namorado Julius, que com toda sua paciência e amor estudou comigo durante fins de semana e noites para me acompanhar nesta etapa final. Obrigada por me dar força e acreditar que eu sou capaz. Sem você tudo teria sido muito mais difícil.

À minha mãe que aceitou que eu saísse novamente de casa para estudar e que acreditou e acredita na minha capacidade e nas minhas decisões. Estamos longe fisicamente, mas meu coração está contigo, mãezinha.

Quero agradecer aos companheiros de Programa e de Departamento pelas conversas, aulas, favores. Todos estes compartilhamentos foram muito importantes.

Aos inúmeros amigos que fiz aqui em São Paulo: Eliane Moreira, José Manuel, Felipe Rosado e Ben, Daniela Paiva, Bianca Prado, Jéssica Vieira, Paulo Eduardo, Viviane Benjamim, Ricardo Boeira, Suellen Souza, Cris Matos, Claudia Feijó, Rafael Souza, Paulo Iun, Juvissan, Paco, Simone Nolasco, Lidiane, Renate, Karine, Mariana Sandoval, Rodrigo Yoshioka, Rafael Mesquiara, dentre tantos outros que passaram pela minha vida, mas me falha a memória.

À Uheyna, minha amiga de Londrina, que mesmo não nos falando com frequência, lembro com muito carinho dos teus conselhos muito preciosos.

Às oportunidades que a vida traz, que são grandes aprendizados lapidadores e também aos desafios e obstáculos que me ajudaram a evoluir.

RESUMO

TAKAHAMA, C.H. **Controle da Anexina 1 sobre a expressão do receptor nuclear proliferador de peroxissomos em diferentes tipos celulares**. 2016. 102f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A proteína Anexina A1 (ANXA1), sintetizada e liberada por fagócitos pela ação de glicocorticóides, é uma proteína anti-inflamatória, pois inibe o influxo de neutrófilos para o foco da inflamação, e induz os mecanismos de eferocitose em neutrófilos e macrófagos. Nosso grupo mostrou que a ANXA1 regula a expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR) em macrófagos. Em continuidade, o presente trabalho investigou o mecanismo da ANXA1 sobre a expressão de PPARγ em macrófagos, e se este controle ocorre em demais leucócitos e tecido adiposo. Para tanto, macrófagos, neutrófilos peritoneais, linfócitos do baço, tecido adiposo epididimal foram obtidos de camundongos machos Balb/c selvagens (*wild type*, WT) ou geneticamente deficientes para ANXA1 ($ANXA1^{-/-}$). Os resultados obtidos mostraram que a ANXA1 controla a expressão proteica e gênica de PPARγ em macrófagos, já que os níveis proteico (Western Blot, WB) e de RNAm (Real-time PCR) para PPARγ constitutivo, bem como induzidos pelos tratamentos *in vitr*o com bezafibrato ou pioglitazona estavam reduzidos em macrófagos de animais $ANXA1^{-/-}$ em comparação com os níveis de macrófagos de animais WT, e o efeito parece ser dependente de CREB (WB), já que os níveis constitutivos deste fator de transcrição estavam maiores em macrófagos de animais $ANXA1^{-/-}$. O tratamento *in vitro* com cicloheximida (CHX), um inibidor da síntese proteica, reduziu a expressão de PPARγ estimulada por bezafibrato ou LYSO-7 em macrófagos de animais WT, reforçando o papel da ANXA1 na expressão gênica de PPARγ. O FPR2 parece não estar envolvido no efeito, uma vez que o pré-tratamento de macrófagos com o antagonista de FPR2 (WRW4) não modificou a expressão de PPARγ em macrófagos de animais WT. O efeito modulador da ANXA1 ocorre em neutrófilos, mas não em tecido adiposo e linfócitos de animais $ANXA1^{-/-}$. Ademais, a deficiência de ANXA1 não alterou a apoptose espontânea de neutrófilos. Em conjunto, os resultados obtidos mostram uma possível via adicional da ANXA1 sobre a resolução da inflamação, controlando a expressão de PPARγ em fagócitos.

Palavras-chave: Anexina-A1, PPAR-gama, inflamação.

ABSTRACT

TAKAHAMA, C.H. **Control of Annexin A1 in the peroxissome proliferator receptor expression in different cell types**. 2016. 102f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Annexin A1 (ANXA1), is a protein synthetized and released by phagocytes due to the action of glucocorticoids, and an anti-inflammatory protein that inhibits neutrophil influx to site of inflammation and induces the mechanisms of efferocytosis in neutrophils and macrophages. Our group has already demonstrated that ANXA1 regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in macrophages. The present work aimed to investigate the role of ANXA1-dependent mechanisms on the expression of PPARγ in macrophages, and if said role also extends to other leukocytes and adipose tissue. For such, macrophages, peritoneal neutrophils, spleen lymphocytes, epididymal adipose tissue were obtained from male Balb/c wild type mice or from mice lacking ANXA1 genetically (ANXA-/-). Obtained results have demonstrated that ANXA1 regulates both proteic and genic expression of PPARγ in macrophages, as protein (Western Blotting, WB) and mRNA (Real-Time PCR) levels of constitutive PPARγ were reduced in macrophages from ANXA1-/- mice in comparison with the observed levels of macrophages from WT mice; the same is true for increased protein and mRNA levels as induced by *in vitro* treatments with bezafibrate or pioglitazone. This effect appears to be CREB-dependent (WB), as the constitutive levels of this transcription factor were found to be increased in macrophages from ANXA1-/- mice. *In vitro* treatment with cycloheximide (CHX), an inhibitor of proteic synthesis, reduced the bezafibrate or LYSO-7 (PPAR pan agonist, 10 μM / 2h) induced expression of PPARγ in WT mice, which further suggests a role for ANXA1 in PPARγ genic expression. FPR2 does not seem to be involved with these effects of ANXA1, as pre-treatment of macrophages from WT mice with an FPR2-antagonist (WRW4) did not alter expression of PPARγ. The modulating effect of ANXA1 can be verified in neutrophils of ANXA-/- mice, but not in adipocytes and lymphocytes from the same animals. Moreover, deficiency of ANXA1 did not affect spontaneous apoptosis of neutrophils. Altogether, the obtained results show the existence of a probable additional pathway with which ANXA1 promotes inflammation resolution, also controlling the expression of PPARγ in phagocytes.

Keywords: Annexin-A1, PPAR-gamma, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão proteica de PPARγ em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

Figura 2. Expressão gênica de PPARγ em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

Figura 3. Expressão proteica de STAT6 em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

Figura 4. Expressão proteica de CREB em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

Figura 5. Expressão proteica de p-CREB em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

Figura 6. Expressão proteica de PPARγ em macrófagos pré-tratados com cilcoheximida

Figura 7. Expressão proteica de PPARγ em macrófagos de animais WT ou ANXA$^{-/-}$ pré-tratados com WRW4

Figura 8. Expressão proteica de PPARγ em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$ pré-tratados com rANXA1

Figura 9. Expressão proteica de PPARγ em neutrófilos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

Figura 10. Expressão proteica de PPARγ em tecido adiposo de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

Figura 11. Expressão proteica de PPARγ em linfócitos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

Figura 12. Relação da ANXA1 sobre a taxa de apoptose de neutrófilos tratados ou não com ligantes de PPAR

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	*ATP-binding cassette transpor*ter
ADAM-10	*ADAM metallopeptidase domain 10*
ANXA1	Anexina A1
ANXA6	Anexina 6
AOX	Acil-CoA oxidase
AP2	Activating protein 2
APC	Células apresentadoras de antígenos
ATL	*Aspirin triggered lipoxin*
AXL	Receptor tirosina quinase
CAP	Proteína associada ao c-Cbl
CCR2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCR5	*Chemokine (C-C motif) ligand 5*
CD3	*Cluster differenciation 3*
CD36	*Cluster differenciation 36*
CHX	Cicloheximida
COX-2	Ciclooxigenase-2
CRE	Elemento responsivo ao cAMP
CREB	*cAMP response element binding protein*
CXCR4	*C-X-C chemokine receptor type 4*
DBD	*DNA binding domain*
Dok-1	*tyrosine kinase 1*
EF2	Fator de alongamento-2
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERK 1/2	*Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*
FasL	*Faz ligand*
FATP-1	*fatty acid transport protein-1*
FPR1	Receptor formil peptídeo 1
FPR2	Receptor formil peptídeo 2
FPR3	Receptor formil peptídeo 3
FPRL1	*Formyl peptide receptor like 1*
GC	Glicocorticóide

GILZ	*Glucocorticoid-induced leucine zipper*
GR	Receptor de glicocorticoide
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GRE	Elementos Responsivos aos Glicocorticoides
GSK3	Glicogênio sintase quinase-3
HDL	*High Density Lipoproteins*
HGF	Fator de crescimento hepático
HMG-CoA	Coenzima-HMG A
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HSP90	*Heat shock protein 90*
i.p.	Intraperitoneal
IL-1β	Interleucinas-1 beta
IκB	IkappaB
IL-2	Interleucinas-2
IL-4	Interleucinas-4
IL-6	Interleucinas-6
IL-9	Interleucinas-9
IL-10	Interleucinas-10
IL-12	Interleucinas-12
IL-13	Interleucinas-13
IFN-γ	Interferon gama
Jmjd3-Irf4	*Jumonji domain containing-3 Interferon regulatory factor 4*
kDa	*kilodalton*
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
LBD	*Ligand binding domain*
LC6	Lipocortina 6
LDL	*Low Density Lipoproteins*
LP-1	Lipocortina-1
LPS	Lipopolissacarídeo
LXA4	Lipoxina A4
LXR	*Liver x receptor*
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos

Mcl-1	*Myeloid cell leukemia 1*
MD	Meio de digestão
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
Mig-6	*Mitogen-inducible gene-6*
MKP-1	(MAP) kinase phosphatase-1
MKRN1	*Makorin ring finger protein-1*
MMP	Metaloproteases
MMP-9	Metaloprotease-9
NF-κB	Fator nuclear Kappa
NCoR	Proteína co-repressora do receptor nuclear-1
nGRE	Elementos não responsivos aos GC
NO	Óxido Nítrico
p-CREB	Fosfo-CREB
p-STAT6	Fosfo-STAT6
PAI-2	Inibidor de ativador de plasminogênio-2
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Fosfoquinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PMN	Polimorfonuclear
PPAR	Receptor proliferador de peroxissomos
PPARα	Receptor proliferador de peroxissomos alfa
PPARγ	Receptor proliferador de peroxissomos gama
PPAR-β/δ	Receptor proliferador de peroxissomos beta/delta
PPREs	Elementos Responsivos aos proliferadores de peroxissomos
PS	Fosfatidilserina
PTX3	*Prototypical tissue pentraxin*
rANXA1	Anexina recombinante
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RXR	Receptor retinóide X
SAA	Proteína sérum amilóide A
SEGRAs	Agonistas seletivos a GR

SEGRMs	Moduladores seletivos de GR
SerpinA3	α-1 antichymotrypsin
SLAP	*Src-like adaptor protein 1*
SOCS3	Supressor de sinalização de citocinas
TCR	Receptor de células T
TG-2	Transglutamina 2
TGF-β	*Tumor growth factor β*
TLR	*Toll like receptor*
TLR4	*Toll like receptor 4*
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFα	Fator de necrose tumoral α
Transportador ABC	*ATP-binding cassette transporter*
TZD	Tiazolinediona
VEGF-α	*Vascular endotelial growth fator*
WT	*Wild type*

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 Aspectos gerais da inflamação 19
1.2 Modulação endógena da inflamação e anexina A1 (ANXA1) 24
1.2.1 Glicocorticóides 24
1.2.2 ANXA1 27
1.3 Receptores proliferadores de Peroxissomos (PPAR) 31
2 OBJETIVOS 37
3 MATERIAL E MÉTODOS 38
3.1 Animais 38
3.2 Obtenção das células e tecido 38
3.3 Tratamentos 39
3.4 Ensaio de Western Blot para quantificação de PPARγ 40
3.5 Expressão gênica de PPARγ em macrófagos 40
3.6 Expressão proteica dos fatores de transcrição STAT6, p-STAT6, CREB ou p-CREB em macrófagos por Western Blot 41
3.7 Viabilidade celular 41
3.8 Análise estatística 43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
4.1 Efeitos da ANXA1 sobre a expressão proteica de PPARγ em macrófagos 44
4.2 Efeitos da ANXA1 sobre a expressão gênica de PPARγ em macrófagos 47
4.3 Influencia da ANXA1 sobre a expressão de STAT6 e p-STAT6 em macrófagos 49
4.4 Influencia da ANXA1 sobre a expressão de CREB e p-CREB em macrófagos 52
4.5 Papel da ANXA1 sobre a síntese de PPARγ 56
4.6 Participação do receptor FPR2 no controle da ANXA1 sobre a expressão de PPARγ em macrófagos 58
4.7 Efeito da ANXA1 recombinante sobre a expressão de PPARγ em macrófagos 61
4.8 Efeitos da ANXA1 sobre a expressão proteica de PPARγ em neutrófilos 63
4.9 Efeitos da ANXA1 sobre a expressão proteica de PPARγ em tecido adiposo 65
4.10 Efeitos da ANXA1 com a expressão proteica de PPARγ em linfócitos 67

4.11 Efeito da ANXA1 sobre apoptose de neutrófilos 69
5 CONCLUSÕES. 71
6 REFERÊNCIAS 73
ANEXOS 95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da inflamação

Os processos inflamatórios contribuem para a homeostase tecidual, pois protegem o organismo de agentes infecciosos, traumas ou injúrias de diferentes origens. Porém, se não controlada ou pela persistência do agente lesivo, a resposta inflamatória pode ser prejudicial ao hospedeiro, podendo evoluir para cronificação, gerando danos aos tecidos (VAN DYKE & SERHAN, 2006; GILROY et al., 2004).

Os sintomas característicos da resposta inflamatória são dor, rubor, calor e tumor (inchaço), como disposto por *Cornelius Celsus* no século I. Estes são desencadeados por uma diversidade de eventos celulares e vasculares, altamente complexos e mediados por uma grande quantidade de substâncias químicas (SERHAN, et al., 2008).

No início do processo inflamatório, mediadores pró-inflamatórios importantes como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, quimiocinas e óxido nítrico são liberados por células sentinelas, como macrófagos teciduais e mastócitos (FREIRE & VAN DIKE, 2013; NATHAN, 2002), e iniciam a inflamação (SAMUELSSON et al., 1987; NATHAN, 2002; MEDZHITOV, 2008). Além de estarem presentes em reações alérgicas, os mastócitos também exercem função contra invasão de patógenos, pois sofrem degranulação e liberam, no estágio inicial da inflamação, histaminas, eicosanoides, fator de necrose tumoral (TNF), citocinas, triptases, proteases, quimiocinas presentes nos grânulos citoplasmáticos. Mais tardiamente, após algumas horas de inflamação, há um aumento da transcrição (*upregulation*) de citocinas e quimiocinas, como TNFα (TNF alfa) e interleucina-4 (IL-4) (LEE, et al., 2002; NATHAN, 2002; URB & SHEPPARD, 2012). Macrófagos participam desde o início do processo inflamatório até sua resolução, atuando na fagocitose e atividade microbicida dos agentes agressores, apresentação de antígenos e na secreção de mediadores inflamatórios (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005; STEINHOFF, et al., 2000; NATHAN, 2002). Os mediadores químicos também favorecem os fenômenos vasculares, como a vasodilatação, consequente aumento de fluxo sanguíneo e aumento de permeabilidade vascular. Em conjunto, os eventos vasculares

favorecem o acúmulo de mediadores químicos plasmáticos no tecido inflamado, o que favorecerá a progressão da inflamação (BUCKLEY, et al., 2013).

Os neutrófilos, também são fagócitos a exemplo dos macrófagos, e são os primeiros leucócitos polimorfonucleares (PMN) circulantes a alcançarem o sítio de lesão. Secretam diferentes enzimas e liberam espécies reativas de oxigênio (ROS) para eliminar o patógeno ou agente causador da inflamação (SERHAN, 2007). Para alcançarem o sitio inflamatório, os neutrófilos circulantes interagem com células endoteliais da microcirculação da área inflamada, pela ligação entre moléculas de adesão e outros receptores nas membranas celulares, subsequentemente atravessam a parede vascular e no tecido, migram orientadamente para o local de lesão, onde exercem suas atividades fagocítica e microbicida para exterminar o agente lesivo (SERHAN, 2007).

Os linfócitos desempenham importante papel dentro da resposta inflamatória adaptativa, atuando contra diversos micro-oganismos invasores e reações alérgicas. Há duas classes de linfócitos: linfócitos B (LB) e linfócitos T (LT). Os linfócitos B são produzidos na medula óssea e são responsáveis por produzir e secretar anticorpos que irão neutralizar ou destruir os antígenos, tendo sido relatado, inclusive, a capacidade de apresentar antígenos (MCHEYZER-WILLIAMS, 2003; MESQUITA JR et al., 2010). Dentro deste grupo, há 3 subtipos de LB, atuando como sentinelas: os linfócitos B convencionais (B2), que atuam na cavidade peritoneal, os linfócitos B1, que exercem função na cavidade pleural, peritoneal e em menor quantidade no baço, e os linfócitos B da zona marginal do baço. Os linfócitos B2 são continuamente produzidos pela medula óssea e geram células de memória, os linfócitos B1 são responsáveis por grande parte da produção de IgM “naturais” e são produzidas predominantemente durante a fase fetal (HARDY, 2006; LUAN & MOREL, 2006; MESQUITA JR et al., 2010; MONTECINO-RODRIGUEZ & DORSHKIND, 2012; TANGYE, 2013) e linfócitos B da zona marginal do baço exercem funções semelhantes aos linfócitos B2, sendo ainda capazes de gerar respostas humorais T independentes (ALLMAN & PILLAI, 2008; MESQUITA JR et al., 2010; ZOUALI & RICHARD, 2011). Os linfócitos T somente reconhecem antígenos apresentados por moléculas de MHC (complexo maior de histocompatibilidade) e expressam em sua superfície o complexo CD3 (*cluster differenciation 3*). Existem 2 subtipos de LT, a saber: LT citotóxicos, que expressam a molécula co-receptora CD8, e LT auxiliares, que expressam CD4, subdivididos em Th1, Th2, Treg, Th17 ou Th22. A

diferenciação dos LT auxiliares depende de qual estímulo a célula Th originária (Th0) recebe, ou seja, o ambiente de citocinas no qual se encontra ao ser estimulado por células APC (células apresentadoras de antígenos) e uma vez diferenciados, cada um subtipo produz determinados tipos de citocinas (PARKIN & COHEN, 2001; AKDIS & AKDIS, 2009; MESQUITA JR et al., 2010). A classe Th1 (linfócito *T helper 1*) é responsável por atuar contra a invasão de patógenos intracelulares, produzindo IFN-γ (interferom gama), IL-2 (interleucina 2) e TNF-β (fator de necrose tumoral beta), afim de ativar macrófagos, induzir a atividade citotóxica de outros linfócitos como o LTCD4 e LTCD8, atuar induzindo a opsonização e fixação de anticorpos do sistema complemento via LB, e estimular a imunidade mediada por células. Já os linfócitos Th2, exercem papel na produção de anticorpos, estando presentes em reações alérgicas e infecções por helmintos também. Estes são capazes de liberar citocinas, como interleucinas (IL) IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, induzindo a troca da classe de imunoglobulinas nos LB para IgE, a produção e ativação de eosinófilos (ROMAGNANI, 2000; MESQUITA JR et al., 2010). Já os linfócitos Th17, são essenciais para a resposta inflamatória mediada por neutrófilos, auxiliando na resposta contra micro-organismos extracelulares e no desenvolvimento de doenças autoimunes e alergias, pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8, IL-17A, IL-17E, IL-22 e IL-26 (MESQUITA JR et al., 2009; MESQUITA JR et al., 2010; KOYASU & MORO, 2012). O subtipo LT CD8 (citotóxicos), age contra antígenos citoplasmáticos como vírus ou células tumorais, ativando a via de morte celular programada (apoptose) por 2 vias: a) pela ação de perforinas e granzinas e b) pela da expressão do receptor FasL (*Faz Ligand*) (PARKIN & COHEN, 2001; MESQUITA JR et al., 2010).

No entanto, se o agente lesivo é persistente, ou se o organismo apresenta deficiência nos mecanismos que regem a inflamação, como resumidamente citado acima, o processo inflamatório não se resolve, e exacerba em intensidade ou em tempo, sendo que neste último caso, pode haver a cronificação do processo (FREIRE & VAN DYKE, 2013; ASHLEY et al., 2012). A resolução do processo inflamatório ocorre de maneira ativa e coordenada, onde os eventos vasculares e celulares são altamente controlados por mediadores químicos, que agora são chamados de pró-resolutivos. Esta etapa é marcada pela mudança de classe mediadores presentes no local da inflamação, ou seja, ao invés dos mediadores inflamatórios citados acima, ocorre o aumento da secreção de mediadores de pró-

resolução, como as IL-10 e IL-4, a ANXA1, as resolvinas, as lipoxinas, as protectinas, as maresinas, os fatores de crescimento (*tumor growth factor β,* TGF-β, e *vascular endotelial growth factor*, VEGF-α), que irão inibir o recrutamento de neutrófilos e induzir o influxo de monócitos, para que estes se diferenciam em macrófagos para exercerem a fagocitose de neutrófilos apoptóticos. Adicionalmente, os mediadores anti-inflamatórios medeiam os processos de cicatrização e angiogênese durante o reparo tecidual. Estes mediadores são secretados por neutrófilos, agora em apoptose, e por macrófagos teciduais, que neste momento, se polarizam para o fenótipo M2, conhecido como anti-inflamatório (GILROY et al., 2004; BANNENBERG & SERHAN, 2010; FREIRE & VAN DYKE, 2013; LEVY et al., 2001; SERHAN & CHIANG, 2008).

Após exercerem suas funções no processo inflamatório, os neutrófilos sofrem *clearance* e podem ser destinados a várias vias distintas, como apoptose ou necrose seguidas de sua eferocitose (SERHAN et al., 2007; BUCKLEY et al., 2013), incorporação de células viáveis na população local (BUCKLEY et al., 2013) ou drenagem para o sistema linfático ou vasos sanguíneos (GILROY et al., 2004; SERHAN et al., 2007; SERHAN et al., 2008). A apoptose é o processo de morte preferencial para a resolução do processo, sendo menos prejudicial ao tecido do hospedeiro, pois neste processo não ocorre a liberação de grânulos intracelulares, com conteúdo proteolítico (GILROY et al., 2004; FREIRE & VAN DYKE, 2013). Ademais, neutrófilos apoptóticos são reconhecidos e fagocitados pelos macrófagos residentes, no processo chamado de eferocitose (GILROY et al., 2004; FREIRE & VAN DYKE, 2013). O processo de apoptose se caracteriza por uma redução da expressão de moléculas de adesão e perda de responsividade a estímulos inflamatórios externos, bem como a condensação do núcleo, evento morfologicamente característico da apoptose (OBERHAMMER et al., 1993; WIDLAK et al, 2002; TAYLOR et al., 2007). Neutrófilos apoptóticos passam a expressar receptores de membrana, como o CXCR4 *(C-X-C chemokine receptor type 4)*, CCR5 (*Chemokine (C-C motif) ligand 5*) e a fosfotidilserina para serem reconhecidos, pelos sinais “eat and *find me*” e fagocitados por macrófagos. A sinalização “*find me*” compreende a secreção de mediadores e expressão de receptores de membrana pelos neutrófilos apoptóticos para atração de fagócitos, e a sinalização “*eat me*” identifica a membrana das células apoptóticas que devem ser fagocitadas, como por exemplo a expressão de fosfatidilserina em neutrófilos apoptóticos (BLUME et al,

2012; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013). O *clearance* de leucócitos é um dos pontos primordiais da resolução da inflamação e promove uma mudança na classe de macrófagos, de pró (macrófagos M1) para anti-inflamatório (macrófagos M2), onde estes passam a sintetizar citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-β (FADOK et al, 1998; SAVILL et al., 2002; MICHLEWSKA et al, 2009; ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013).

Macrófagos sofrem polarização M1 para M2 estimulados pela presença de citocinas como IL-4, IL-13 ou IL-10 de forma indireta, pela ativação do eixo Jmjd3-Irf4 (*jumonji domain containing-3 Interferon regulatory factor 4*), um eixo que tem sido relacionado com a polarização de macrófagos, onde o fator de transcrição Irf4 foi identificado como o fator que controla a polarização para o fenótipo M2 (SATOH et al., 2010). Ocorre também aumento dos fatores de transcrição STAT3 e STAT6, que favorecem o processo de polarização (SICA & MANTOVANI, 2012). Pelo fato de participarem do processo de resolução da inflamação, estes tipos celulares são capazes de estimular a proliferação celular e reparo tecidual, eferocitose, aumentando a expressão de moléculas *scavenger* (PESCE et al., 2009; ; SICA & MANTOVANI, 2012; ITALIANI & BORASCHI, 2014) e secretar citocinas anti-inflamatórias como IL-1ra (antagonista do receptor de interleucina 1), IL-10 e TGFβ (MANTOVANI et al., 2004; NOVAK & KOH, 2013; ROSZER, 2015).

A polarização de macrófagos tem sido alvo de estudos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratar doenças, como câncer de mama, câncer de ovário, aterosclerose, melanoma, asma, dentre outros (SICA & MANTOVANI, 2012). Estratégias que afetam a polarização e ativação de macrófagos pelas vias do M1 e M2, recrutamento, depleção ou mudança para fenótipo M1 são alguns exemplos que podem ser empregados como alternativas terapêuticas (SICA & MANTOVANI, 2012). Estudos demonstraram que as TZD (tiazolinedionas), ativando PPARγ (receptor proliferador de peroxissomos) em macrófagos, apresentam efeitos anti-inflamatórios sistemicamente, aumentam a sensibilidade à insulina e também aumentam o número de macrófagos M2 no tecido adiposo e lesões ateroscleróticas, evidenciando, assim, que a ativação de PPARγ seja um importante regulador da inflamação (CHARO, 2007). Atualmente, macrófagos M2 já parecem ser alvos terapêuticos da classe de medicamentos tiazolinedionas (TZD), que funcionam como ligantes de PPARγ. Ensaios pré-clínicos demonstraram que o agonista PPAR promove a polarização para o fenótipo M2 e

homeostasia metabólica em macrófagos do tecido adiposo, mostrando que essa alteração parece ser importante para o controle do diabetes (SICA & MANTOVANI, 2012).

Do exposto fica evidente que a inflamação é um processo complexo, multimediado por diferentes células e substâncias químicas, e que este processo deve ser controlado para não causar prejuízos ao organismo. Desta forma, a seguir, abordamos duas estratégias endógenas do controle deste processo, sendo que seus análogos sintéticos possuem potencial emprego como agentes antiinflamatórios.

1.2 Modulação endógena da inflamação e anexina A1 (ANXA1)

1.2.1 Glicocorticóides

Durante a inflamação, os glicocorticoides (GCs) endógenos (cortisol em humanos e corticosterona em murinos) são produzidos e secretados pelas glândulas supra-renais, e desempenham um papel crítico no desenvolvimento e na resolução da inflamação. Sua síntese e liberação são regulados pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA), seguindo também, os ciclos circadiano e ultradiano (BIDDIE et al., 2011; KADMIEL & CIDLOWSKI, 2013). Os glicocorticoides ao se ligarem ao receptor citsosólico de glicocorticóides (GR), ligam-se à sequencia de ligação de glicocorticoides no DNA (elementos responsivos aos glicocorticoides- GRE) ou diretamente interferem com fatores de transcrição e, assim, levam à indução ou repressão de transcrição de proteínas que interferem no processo inflamatório (BIDDIE et al., 2011; KADMIEL & CIDLOWSKI, 2013).

Quando não ligado aos GCs, o GR se encontra ligado a proteínas chaperonas, como a *hsp90* (*heat shock protein 90)*, a imunofilinas ou outros fatores que evitam sua degradação (VANDEVYVER et al. 2012; VANDEVYVER, 2013). Ao se ligar a GCs, o homodímero GR-GC sofre uma mudança conformacional, se transloca para o núcleo e altera a transcrição, por meio da indução ou repressão de mRNA. A indução ou repressão ocorre dependendo da região a qual o homodímero formado se liga (KADMIEL & CIDLOWSKI, 2013, ZEN et al., 2011). A indução transcricional, também chamada de transativação, age por um mecanismo direto, levando à síntese de proteínas anti-inflamatórias como a ANXA1, IκB (IkappaB), lipoxina A4,

ou IL-10 (SONG et al., 2005; CLARK, 2007; STAHN et al., 2007); Também foi relatado um segundo mecanismo que ocorre via elementos não responsivos aos GCs (nGRE), onde alguns genes pró-inflamatórios são inativados, a partir da ligação do complexo GC-GR ao nGRE, (ZEN et al., 2011; VANDEVYVER et al., 2013). Já a repressão transcricional, também denominada transrepressão, podendo agir indiretamente para inibir o processo inflamatório, inibindo a translocação para o núcleo de fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (NF-κB) e *activating protein-1* (AP-1), impedindo a ligação destes ao DNA e inibindo, então, a transcrição de diversas citocinas, como quimiocinas, enzimas e moléculas de adesão. O NF-κB estimula a transcrição de diversos genes envolvidos na resposta imune e a proteína AP-1 é capaz de regular diversas etapas da proliferação e diferenciação celular (DE BOSSCHER et al., 2003; SONG et al., 2005; CLARK, 2007; STAHN et al., 2007 BOSSCHER et al., 2010; VANDEVYVER et al., 2013). Estudos *in vitro* demonstraram que os GC inibem indiretamente NF-κB induzindo a transcrição da proteína IκBα em células HeLa, monócitos e linfócitos T (RAY & PREFONTAINE, 1994; SCHEINMAN et al., 1995; WISSINK et al., 1998), porém não em células endoteliais (BROSTJAN et al., 1996) e, subsequentemente, WISSINK et al. (1998) mostraram que os GC são capazes de ativar o gene IκBα diretamente em células a549. Além disso, foi demonstrado também que a subunidade RelA do NF-κB interage fisicamente com o GR *in vitro,* inativando-o (RAY & PREFONTAINE, 1994; SCHEINMAN et al., 1995; CALDENHOVEN et al., 1995; WISSINK et al., 1997; WISSINK et al., 1998).

Também tem sido relatada a ação não-genômica dos GC, sendo mais rápida e caracterizada pela interação da proteína com a membrana das células. Esta ação pode levar de segundos a minutos e está relacionada com secreção hormonal, excitabilidade neuronal, morfologia celular, metabolismo de carboidratos, dentre outros processos, como efeitos anti-inflamatórios sobre neutrófilos (BORSKI, 2000; KADMIEL & CIDLOWSKI, 2013, SONG & BUTTGEREIT, 2006; SAFFAR et al., 2011).

Outro modo pelo qual os GCs podem atuar é pela modulação negativa sobre a via da MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), uma proteína que contribui para o processo inflamatório, ativando mediadores pró-inflamatórios como NFkB e TNFα, e células como linfócitos, macrófagos, neutrófilos e mastócitos (AYROLDI et

al., 2012). Essa modulação ocorre pela indução de fatores que regulam negativamente a MAPK como *mitogen-inducible gene-6* (Mig-6), *Src-like adaptor protein 1* (SLAP), *tyrosine kinase 1* (Dok-1), GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine zipper*), MKP-1 ((*MAP) kinase phosphatase-1*) e ANXA1.Ainda, pode ocorrer ação não genômica envolvendo um *crosstalk* entre os GC e componentes da via da MAPK, onde os GC interagem diretamente com a membrana celular (AYROLDI et al., 2012; KADMIEL & CIDLOWSKI, 2013). Esta subfamília de proteínas quinases atua em respostas a estímulos extracelulares (mitógenos) levando a proliferação, desenvolvimento e apoptose. Na inflamação, essa família de proteínas ativa a transcrição de fatores pró-inflamatórios, como citocinas, sendo assim, quando inibida, a síntese de citocinas é interrompida (JOHNSON & LAPADAT, 2002; AYROLDI et al., 2012).

Os GC são utilizados como primeira escolha de tratamento de diversas manifestações inflamatórias, visto seu amplo espectro de atuação no processo inflamatório. Porém, estudos tem relatado que estes exercem também ação pró-inflamatória, dependendo do tipo de exposição aos GC e também do estado basal do sistema imune (CRUZ-TOPETE & CIDLOWSKI, 2015). GALON et al. (2002) mostraram que os GCs podem induzir *in vitro* a expressão de genes relacionados à imunidade inata, como TLR (*toll-like receptor*) em células mononucleares e, nas mesmas células, os GCs foram capazes de inibir a expressão de genes pró-inflamatórios na resposta imune adaptativa. LANNAN et al., (2012) mostraram em células A549 que a dexametasona ou o TNFα podem coregular a expressão vários genes, incluindo a proteína de fase aguda serpina A3 (α-1 antichymotrypsin), uma proteína de fase aguda que tem sido associada a inúmeras doenças inflamatórias. Ainda, estudos complementares aos de LANNAN et al. (2012) demonstraram *in vivo* e *in vitro* a associação de GCs com TNFα teve um efeito sinérgico e aumentaram o nível protéico e de mRNA da proteína serpina A3. Diante disso, pode-se notar a complexidade de ação dos GC, onde o aumento da proteína serpina A3 pode representar um dos efeitos adversos do tratamento crônico com GCs. Os efeitos anti-inflamatórios exercidos pelos mesmos justificam-nos como primeira escolha de tratamento de diversas doenças, porém estes apresentam também efeitos adversos significantes (CRUZ-TOPETE & CIDLOWSKI, 2015). Desta forma, a busca por novos mecanismos ou alvos terapêuticos dos GC que causam menos efeitos adversos são de interesse científico e da indústria farmacêutica. Neste sentido,

pode-se citar os agonistas seletivos a GR (SEGRAs) e os moduladores seletivos de GR (SEGRMs), que visam favorecer os efeitos transrepressores dos GC (ROSEN & MINER, 2005; MCMASTER & RAY, 2007; MCMASTER & RAY, 2008; SUNDAHL et al., 2015).

1.2.2 ANXA1

Dentre os mecanismos anti-inflamatórios dos GCs, a síntese de ANXA1 é bastante relevante para o controle do desenvolvimento e resolução da resposta inflamatória inata. A ANXA1, também conhecida como lipocortina-1 (LP-1), e anteriormente chamada de lipomodulina, macrocortina ou renocortina, é uma proteína anti-inflamatória e pró-resolutiva de 37kDa, sendo composta por 346 aminoácidos (ROSENGARTH & LUECKE, 2003; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009; GERKE et al., 2005; D'ACUNTO et al, 2014). Está envolvida na inibição da síntese de eicosanóides e fosfolipase A2 (AP2), podendo também modular o tempo de vida de leucócitos na circulação (NORLING et al., 2009); recrutar monócitos para auxiliar a resolução do processo inflamatório (NORLING et al., 2009; BLUME et al., 2012); estimular a quimiocinese em neutrófilos (NORLING et al., 2009; DALLI et al., 2012); participar dos processos de apoptose de neutrófilos; fagocitose dos neutrófilos apoptóticos por macrófagos e, portanto, na eferocitose (NORLING et al., 2009; VAGO et al., 2012; MADERNA et al., 2005); da imunidade adaptativa durante o processo inflamatório (PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009), diferenciação (FLOWER & ROTHWELL, 1994; SILISTINO-SOUZA et al., 2007) e proliferação celular (atividade anti-proliferativa em macrófagos) (ALLDRIDGE et al., 1999; LIM & PERVAIZ, 2007); sendo também importante nos processos intracelulares, como os que controlam o tráfego de células em diferentes compartimentos (efeitos antimigratórios de neutrófilos e monócitos), exocitose e endocitose, e organização do citoesqueleto no processo de migração e fagocitose (NORLING & PERRETTIl., 2013; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009, GERKE & MOSS, 2002; RESCHER et al., 2002; PATEL et al., 2012; DALLI et al., 2012; MACHADO et al., 2014; MACHADO et al., 2015).

A superfamília das anexinas, composta de 13 isoformas, é caracterizada por apresentar duas características comuns: 1) um domínio altamente conservado, o

domínio central, formado por 4 sequências de 70 aminoácidos (com exceção do LC6 -lipocortina 6, ANXA6 ou anexina A6, que apresenta 8 sequências de 70 aminoácidos ao invés de 4), de cerca de 40-60% de homologia estrutural e a porção N-terminal, na qual difere entre os membros do grupo e é a responsável pela função anti-inflamatória (ROSENGARTH et al., 2003; LIM & PERVAIZ, 2007; DONOHUE et al., 2014); 2) apresentam a capacidade de ligar-se reversivelmente a fosfolipídios de membrana, carregados negativamente, de maneira cálcio dependente (GERKE & MOSS, 2002; D'Acunto et al., 2014). O cálcio-dependente parece agir como uma ponte entre as cadeias ácidas laterais da membrana (porção polar) e a porção fosforil da ANXA1 (hidrofóbica), resultando em interações fracas, gerando, assim, uma interação também hidrofóbica, fazendo com que a ligação seja reversível (SWAIRJO et al., 1995; DONOHUE et al., 2014). Quando não ligada ao cálcio, o seu sítio de ligação encontra-se estericamente impedido; por outro lado, na presença de cálcio, ocorre mudança conformacional na molécula permitindo, então, que a região N-terminal seja exposta e ocorra a ligação da ANXA1 com seu receptor receptor formil peptídeo 2 (FPR2) (LINA & PERVAIZ, 2007; GERKE, et al., 2005; PERRETTI, 2003). A porção N-terminal da ANXA1, (composta de aproximadamente 49 aminoácidos) é a região reguladora que contém sítios para fosforilação, proteólise e clivagem, sendo então, a região que controla as funções anti-inflamatórias e pró-resolutivas dessa proteína (RAYNAL & POLLARD, 1994; LIM et al., 1998; YANG, et al., 1999; PERRETTI, 2003). Esta região é um local altamente regulável, podendo ser fosforilada em seus sítios de tirosina, pela ativação do receptor fator de crescimento epidérmico (EGF) ou fator de crescimento hepático (HGF), ou no sítio de serina, pela proteína quinase C (PKC), e até mesmo clivada por proteases ou elastases após ser mobilizada e externalizada na membrana celular (PIN et al., 2012; D'ACUNTO et al., 2014; RESCHER et al., 2006; VONG et al., 2007). Em alguns tipos celulares, tem sido relatado que a fosforilação é um pré-requisito para a ANXA1 ser secretada, como é o caso dos macrófagos e neutrófilos (D’ACQUISTO et al., 2008; DALLI et al., 2012; D'ACUNTO et al., 2014).

A ANXA1 está significativamente presente no citoplasma de células do sistema imune inato, como neutrófilos (2-4%), monócitos, macrófagos, também em célula do sistema imune adaptativo, como as células T e células B, (D’ACQUISTO et al., 2007, GAVINS & HICKEY, 2012), mastócitos (SILISTINO-SOUZA et al., 2007; OLIANI et al., 2000), eosinófilos (PERRETTI & FLOWER, 2004; GAVINS & HICKEY,

2012) e fibroblastos (SOLITO et al., 1998; TAGOE et al., 2008), e de células epiteliais de vários tecidos como pulmões, medula óssea, intestino e rins, endotélio, sendo também encontrado em fluido biológico como o líquido sinovial (D'ACQUISTO et al., 2008; PERRETTI & DALLI, 2009; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009; LIM & PERVAIZ, 2007; DALLI et al., 2012; GIROL et al, 2013). Além de ser encontrada no citoplasma, pode também estar presente em organelas citoplasmáticas como endossomos, fagossomos e corpos multivesiculares (PATEL et al., 2011, FUTTER & WHITE, 2007; GERKE et al., 2005; LIM & PERVAIZ, 2007).

Na presença de estímulos inflamatórios, como a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular, a ANXA1 é mobilizada dos grânulos de gelatinase para a superfície celular e secretada no meio extracelular, sendo então exposta e, na presença de cálcio, sofre uma mudança conformacional para que a região N-terminal seja exposta e ocorra a ligação da ANXA1 com o receptor (PERRETTI et al., 1996; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009; GAVINS et al., 2012). A secreção da ANXA1 ocorre por diferentes mecanismos, dependendo do tipo celular, a saber: em macrófagos há predominância do sistema transportador ABC ("*ATP-binding cassette transpo*rter"); em neutrófilo, onde mais de 60% da proteína encontra-se estocada em grânulos de gelatinase, a liberação ocorre por meio de fusão destes com a membrana celular em resposta à ativação celular como estímulos quimiotáticos ou adesão às células endoteliais, no entanto, também já foi relatado que a ANXA1 pode ser externalizada frente a estímulos de ativação celular, porém sem adesão à monocamada endotelial (VONG et al., 2007); já em células da pituitária, a ANXA1 é translocada para a membrana celular após fosforilação da serina 27 no resíduo amino-terminal (PERRETTI et al., 1996; VONG et al., 2007; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009). DALLI et al. (2008) também demonstraram a expressão seletiva da ANXA1 na superfície de micropartículas, que são pequenas vesículas, também chamadas de ectossomos, onde DISTLER et al. (2005) demonstraram que estas são geradas a partir de movimentos *flippase* e *scramblase* de fosfolipídios de neutrófilos aderidos ao endotélio (neutrófilos ativados), fazendo com que a sua bicamada lipídica se encontre exposta, expondo, assim, a fosfatidilserina. As micropartículas inibem a interação entre neutrófilos e o endotélio *in vitro* e também desencadeiam efeitos antimigratórios de neutrofilos (PERRETTI et al., 2000; PERRETI & DALLI, 2009; GAVINS & HICKEY, 2012).

Após sua secreção e fosforilação, a ANXA1, na presença de cálcio, interage

com o receptor transmembrana acoplado à proteína G inibitória (G_i), o FPR2, denominado ALXR em humanos. Há evidências que a ANXA1 ligue-se ainda a FPRL1 (receptor formil peptídeo 1, *formyl peptide receptor like 1*), que também é o receptor da lipoxina A4, uma molécula anti-inflamatória de origem lipídica que tem uma potente ação quimioatraente de macrófagos, estimulando, inclusive, a fagocitose de células apoptóticas pelos mesmos (CHIANG et al., 2006 COORAY et al., 2013). Os FPRs são expressos em diversos tipos celulares como neutrófilos, macrófagos, monócitos, células endoteliais e epiteliais (PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009, CHIANG et al., 2006, BABBIN et al., 2006). Estudos de SOLITO et al. (2003a) realizados em células da pituitária apontaram que os GCs podem também induzir a fosforilação da serina da ANXA1 e sua translocação para a membrana celular, pela via não-genômica, dependente das vias do PKC (proteína fosfoquinase C) e Ca^{2+}, PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase). Esta informação é suportada por estudos adicionais de SOLITO et al. (2006), que demonstraram que a translocação da ANXA1 também requer a coenzima-HMG A (HMG-CoA) e miristoilação, reafirmando que a fosforilação da serina na ANXA1 é essencial para a translocação da mesma. CATTANEO et al. (2013) ainda incluíram o envolvimento do receptor FPR2 durante o processo.

Durante o desenvolvimento do processo inflamatório, a ANXA1 inibe a adesão de leucócitos, em especial de neutrófilos, na parede vascular da microcirculação inflamada, por induzir o desligamento destas células do endotélio e, assim, inibe subsequente o extravasamento de neutrófilos dos vasos sanguíneos (LIM & PERVAIZ, 2007; PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009), sendo que este efeito é causado pela clivagem da moléculas de adesão L-selectina em leucócitos circulantes (HAYHOE et al., 2006; GAVINS & HICKEY, 2012). Além de neutrófilos, também tem sido demostrado que a ANXA1 exerce funções anti-migratórias em monócitos em processos inflamatórios agudos (GETTING et al., 1997; LIM & PERVAIZ, 2007). Ainda, a ANXA1 é capaz de inibir a PLA2 diretamente, pela interação entre ANXA1 e PLA2 (KIM et al., 1994; LIM & PERVAIZ, 2007), exerce também efeito anti-pirético (DAVIDSON et al., 1991; LIM & PERVAIZ, 2007) e bloqueia a hiperalgesia mediada pela ciclooxigenase-2 (COX-2) (FERREIRA et al., 1997; LIM & PERVAIZ, 2007).

Na resolução do processo inflamatório, a ANXA1 induz a apoptose de neutrófilos, mediado pelas vias de morte celular caspase-3 e Bax, junto com a

inibição de vias de sobrevivência celular *myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1), *Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2* (ERK1/2) e NF-kB, e a fagocitose destas células apoptóticas por macrófagos, no processo de eferocitose (SCANNELL et al., 2007; PERRETI & SOLITO, 2004; DALLI et al., 2008; VAGO et al., 2012). Neutrófilos em processo apoptose, assim como fagócitos, secretam ANXA1, que funciona como um sinal de "*eat me*", favorecendo a externalização da fosfatidilserina (PS) e o reconhecimento das mesmas pelas células fagocíticas, promovendo, assim, a fagocitose por macrófagos tanto das próprias células como das células que se encontram no sítio inflamatório (LIM et al., 1998; SCANNELL et al., 2007; VAGO et al., 2012). Durante o processo de apoptose, a ANXA1 se transloca para o núcleo e é inibida pela super-expressão de BCL2 (proteína anti-apoptótica) (ISHIDO, 2005; LIM & PERVAIZ, 2007). Caso o processo de remoção das células apoptóticas falhe, estas se tornam necróticas e, neste contexto, a ANXA1 inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos que sofreram eferocitose (BLUME et al., 2009; BLUME et al., 2012). Foi relatado o papel da ANXA1 na sinalização de "*find me*" pelas células em processo de necrose, após ter sido clivada por proteínas codificadas pelo gene *ADAM metallopeptidase domain 10 (*ADAM-10), que são as desintegrinas e metaloproteinases, liberando a sua porção N-terminal (BLUME et al., 2012).

Nosso grupo de pesquisa tem ampliado os estudos referentes a mecanismos de ação da ANXA1 sobre a resolução da inflamação. Já mostramos que a ANXA1 pode regular a expressão do PPARγ em macrófagos em condições basais ou sob tratamento de agonista PPARpan LYSO-7. Ainda, demonstramos que o PPAR tem participação relevante na fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$ também em condições basais ou sob tratamento de LYSO-7 (SANTIN, comunicação pessoal, 2013). Como descrito a seguir, os PPAR exercem diferentes efeitos modulatórios sobre a inflamação, incluíndo a resolução da mesma. Desta forma, o controle da ANXA1 sobre a expressão de PPARγ pode ser um mecanismo importante no desenvolvimento e controle da resposta inflamatória aguda.

1.3 Receptores proliferadores de Peroxissomos (PPAR)

Os receptores nucleares atuam como fatores de transcrição que regulam a

expressão de genes envolvidos na adipogênese, inflamação, reprodução, desenvolvimento e metabolismos em geral, mais especificamente os atuantes na beta oxidação (BARISH et al., 2006; AHMADIAN et al., 2013). A família de receptores nucleares da qual o PPAR faz parte, é composta por 48 membros, onde estão incluídos receptores endógenos ditos clássicos, que são os que intermediam ações de hormônios esteróides, tireoidianos e de vitaminas A e D (EVANS, 1988; CHAWLA, et al., 2011; SCHOONJANS et al., 1996; MAGLICH, et al., 2001; AHMADIAN et al., 2013). Esta família de PPAR é composta por 3 membros, PPARα [NR1C1], PPARγ [NR1C3], e PPAR-β/δ [NR1C2] (WILSON, et al., 2000; WAHLI & MICHALIK, 2012). O PPARα pode ser encontrado em tecidos que exercem catabolismo de ácidos graxos, como tecido adiposo marrom, fígado, coração, rins e intestino; já o PPAR-β/δ exerce funções importantes funções na pele, intestino, placenta, músculo cardíaco, tecido adiposo e cérebro; finalmente, o PPARγ, exerce funções essenciais no tecido adiposo, sendo encontrado, também, no cólon e linfócitos Treg de tecido adiposo visceral, neutrófilos, macrófagos (MICHALIK et al., 2006; WAHLI & MICHALIK, 2012; AHMADIAN et al, 2013).

Assim como a ANXA1, os PPARs também possuem domínios altamente conservados, denominado região C-terminal (DBD – DNA *binding domain* e LBD – *ligand binding domain*) e uma região variável entre cada subtipo, localizada na região N-terminal. Os ácidos graxos e derivados eicosanoides e prostaglandinas são alguns dos ligantes endógenos de PPAR descritos na literatura, além de inúmeros compostos que foram sintetizados e são empregados para o tratamento de diversas doenças, mas em especial para o tratamento de diabetes (ligantes de PPAR da classe dos tiazolidinedionas) e dislipidemias (ligantes de PPAR da classe dos fibratos) (ROSEN et al., 2001; AHMADIAN et al., 2013). Além disso, na presença de ligantes, são ativados pelo ácido 6-cis-retinóico, formam heterodímeros com o receptor retinóide X (RXR), formando o complexo PPAR-RXR, e se ligam a elementos responsivos aos proliferadores de peroxissomos (PPREs), compostos por hexanucleotódeos que contém repetições AGGTCA, denominados DR-1 (repetições diretas), que estão situados em sítios regulatórios de cada gene (MANGELSDORF et al, 1992; KLIEWER et al., 1992; BERGER & MOLLER, 2002; WILSON, et al., 2000). Esta sequência, assim como pequenas variantes desta, estão presentes em regiões promotoras de acil-CoA oxidase (AOX) ou a proteína ligadora de ácidos graxos (aP2) (WAHLI et al, 1995; WILSON et al., 2000). Uma vez formado, o

heterodímero sofre uma mudança conformacional, liberando elementos repressores, ocorre o recrutamento de fatores co-ativadores, iniciando o processo de transativação (WILSON et al., 2000; CHAWLA et al., 2001). Na ausência de ligantes, o PPAR permanece ligado a repressores (NCoR-1 – proteína co-repressora do receptor nuclear-1, por exemplo), junto a histonas deacetilases e também à enzimas modificadas da cromatina, e quando na presença de um ligante, o elemento repressor é liberado e ocorre a ligação com co-ativadores (WILSON, et al., 2000; CHAWLA, et al., 2001; BARISH et al., 2006; HUANG & GLASS, 2010).

O receptor mais estudado dentre as três isoformas é o PPARγ. Este é homólogo dentre as várias espécies comparadas, havendo 95% de similaridade entre humanos e murinos e, por isso, tem sido extensivamente clonado (WILSON, et al., 2000; MICHALIK et al., 2006; WAHLI & MICHALIK, 2012). Nos seres humanos, estão presentes 3 isoformas de PPARγ, que variam em sua porção N-terminal: PPARγ 1, PPARγ 2 e PPARγ 3, onde PPARγ 1 e PPARγ 2 codificam a mesma proteína, enquanto PPARγ 3 codifica uma proteína contendo 28 aminoácidos a mais na porção N-terminal que PPARγ 1 e PPARγ2. Ainda, sua distribuição ocorre distintamente: PPARγ 1 tem distribuição mais ampla e pode ser encontrada em tecido cardíaco, intestinos, cólon, rins, pâncreas, baço e músculo esquelético, e também em células do sistema imune; PPARγ 2 é expressa predominantemente no tecido adiposo; e PPARγ 3 está especialmente localizado em tecido adiposo, macrófagos localizados no tecido adiposo, pulmão, baço e no cólon (WILSON, et al., 2000; MICHALIK et al., 2006; WAHLI & MICHALIK, 2012).

O PPARγ é um fator de transcrição crítico na etapa da regulação da diferenciação, maturação e sobrevivência de adipócitos, sendo ativado principalmente durante a diferenciação de adipócitos, onde foi demonstrado que o PPARγ reprime a expressão do gene *ob*, que é responsável pela codificação da leptina e também parece bloquear os efeitos inibitórios do TNFα, um importante fator de sinalização de adipócitos (ROSEN et al., 1999; SHIBASAKI et al., 2003; IMAI et al., 2004; EVANS et al., 2004; MICHALIK et al., 2006;); regula o metabolismo da glicose, aumentando a sensibilidade da insulina (RIEUSSET et al., 2002; SAVAGE et al., 2003; MICHALIK et al., 2006); modula diversos outros genes envolvidos no armazenamento e na utilização de energia como aP2, acil-CoA sintetase, lipase lipoproteica, *fatty acid transport protein-1* (FATP-1) e CD36, homeostase da glicose, como o transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) e a proteína associada ao c-Cbl

(CAP), e fatores secretados pelo tecido adiposo, como adiponectina, resistina, leptina e TNF-α (TONTONOZ et al., 1994; SCHOONJANS et al., 1995; SCHOONJANS et al., 1996; KALLEN & LAZAR, 1996; DE VOS et al., 1996; SFEIR et al., 1997; WILSON, et al., 2000; AHMADIAN et al., 2013). Adicionalmente, este também parece exercer papel anti-inflamatório durante o processo de aterosclerose, envolvendo células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos, que parecem ser regulados pelo PPARγ, onde a ativação do receptor inibe a expressão de CCR2 (*chemokine (C-C motif) ligand 2*) em monócitos (BABAEV et al., 2005; HAMBLIN et al., 2011; WAHLI & MICHALIK, 2012), e a ativação de PPARγ em macrófagos inibe a atividade de metaloproteases (MMP) pró-inflamatórias, entre as quais a MMP-9 (MARX et al., 1998; RICOTE et al., 1999; TAVARES et al., 2007).

Ademais, um papel muito importante do PPARγ para o presente estudo, é a sua participação no desenvolvimento e resolução do processo inflamatório. O PPARγ atua em células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos (AHMADIAN et al., 2013). Em células dendríticas, além do receptor regular o metabolismo lipídico, este é capaz de aumentar a capacidade de captura e apresentação de antígenos; estimular a maturação, aumentando a expressão de marcadores de superfície como CD80 e CD86 (GOSSET et al., 2001); aumentar a ativação, reduzindo a síntese de IL-12; e aumentar a migração e síntese de citocinas pela repressão da transcrição de diversos genes (FAVEEUW et al., 2000; SZATMARI et al., 2006; SZATMARI et al., 2007; AHMADIAN et al., 2013). Em macrófagos, o PPARγ estimula a diferenciação de monócito para macrófago (TONTONOZ et al., 1998), induzido por citocinas Th2 como IL-4 ou IL-13 (BOUHLEL et al., 2007; RIGAMONTI et al., 2008); estimula a fagocitose de neutrófilos apoptóticos aumentando a expressão de elementos importantes para o processo como CD36, receptor tirosina quinase (AXL), transglutamina 2 (TG2) e *prototypical tissue pentraxin (*PTX3) (MAJAI et al., 2007; AHMADIAN et al., 2013); induz a secreção de mediadores anti-inflamatórios, como o IL-10 e o *liver x receptor* LXR (LXR) (ODEGAARD et al., 2007; HUANG & GLASS, 2010); e a inibe a secreção do fator pró-inflamatório TNFα (BERGER & MOLLER, 2002). Durante a inflamação, os macrófagos encontram-se ativados e a ativação de PPARγ inibe a transcrição gênica (transrepressão) de moléculas que codificam mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico sintase, IL-1β, IL-12 e MMP-9 (HUAN & GLASS, 2010). PASCUAL et al. (2005) demonstraram que em macrófagos de murinos, o PPARγ

inibe a transcrição gênica de fatores transcritos a partir do NF-kB, pela ligação do PPARγ ao NCoR, que se associa, por fim ao NF-kB. Interessantemente, ODEGAARD et al., (2007) demonstraram que camundongos PPARγ$^{-/-}$, apresentam deficiência na maturação de macrófagos M2. A diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2 ocorre via STAT6.

Ainda, diversos estudos têm demonstrado outras participações do PPARγ no processo da resolução da inflamação. A ativação de PPARγ em células T também inibem a síntese de moléculas pró-inflamatórias, como IL-2. Em situações onde o receptor de células T (TCR) é estimulado, o PPARγ se liga ao fator de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas), fator relacionado com a expressão de IL-2, bloqueando o seu sítio de transcrição (YANG et al., 2000; WAHLI & MICHALIK, 2012). Após ser transcrito, o PPARγ, de maneira célula/tecido específico, também pode sofrer modificações e ser fosforilado, acetilado, sumoilado, ou ubiquitinado (BEEKUM et al., 2009; WAHLI & MICHALIK, 2012; AHMADIAN et al., 2013). A fosforilação pode ocorrer de maneira célula dependente e responde à diferentes fosfoproteínas como fosfoquinase A (PKA), PKC, proteínas quinase ativadas por mitógenos, AMP quinase (AMPK), glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) e um dos sítios de fosforilação estudados é na porção serina 273 (s273), que uma vez fosforilada é capaz de reduzir a expressão de alguns genes alvo do PPARγ, como a adiponectina (BURNS & HEUVEL, 2007; CHOI et al., 2010). A acetilação parece ser um dos mecanismos de ação das TZD, pois estas aumentam a associação do PPARγ com o gene sirtuina 1 (SirT1) (QIANG et al., 2012). A sumoilação ocorre quando o PPARγ liga-se ao receptor nuclear corepressor (NCoR) e associa-se ao promotor do NF-kB, estimulando a transrepressão de genes pró-inflamatórios (PASCUAL et al., 2005; WAHLI & MICHALIK, 2012) Por fim, a ubiquitinação tem sido relacionada ao receptor PPARγ em adipócitos, onde a estabilidade do receptor é controlada pela via do proteossomo da (KILROY et al., 2009). KIM et al., (2014) demonstraram que em células 3T3-L1 e C3H10T1/2, a ligase tipo E3 MKRN1 (*makorin ring finger protein-1*) induz a ubiquitinação do PPARγ, reduzindo também a diferenciação de adipócitos, identificando, inclusive, dois sítios de ligação no receptor: o sítio lisina 184 e 185. Dentre as modificações, destacam-se: a ativação dos PPARs leva a expressão de PPARγ, importante para a mudança de fenótipo de M1 para M2 (TONTONOZ et al., 1998); a ativação de PPARγ induz a apoptose de neutrófilos, devido à interferência da via de sinalização do NF-kB, onde a via

encontra-se com atividade reduzida devido à fosforilação do NF-kB em células endoteliais e miócitos (BIRRELL et al., 2004; WAHLI & MICHALIK, 2012); a ativação de PPARs em macrófagos inibe a supressão da produção de óxido nítrico (NO), e aumenta a expressão de CD36 em macrófagos (sinalização *eat me*), que é relevante para o reconhecimento de neutrófilos apoptóticos na resolução do processo (WILSON et al., 2000; ZAMORA et al., 2012; PARKS et al., 2013).

Em conjunto, os dados apresentados acima mostram que os PPAR são receptores citoplasmáticos relevantes para o controle da homeostasia e que os ligantes destes, com função agonista, podem ser importantes ferramentas terapêuticas na inflamação. Os estudos do nosso grupo tem contribuído para a literatura dos PPARs como anti-inflamatórios (SANTIN et al., 2013a, 2013b) e mostrado recentemente que o controle da expressão de PPAR pode ser um dos mecanismos de ação da ANXA1 na resolução do processo inflamatório.

Ademais, estudos obtidos previamente no laboratório mostraram que o tratamento de macrófagos peritoneais de animais selvagens (WT) com LYSO-7, um agonista PPAR pan, foi capaz de induzir a fagocitose de neutrófilos apoptóticos e a ANXA1 parece controlar a expressão proteica de PPARγ em macrófagos estimulados ou não com o agonista PPAR pan LYSO-7 neste modelo exprimental.

Em conjunto, os dados de literatura mostram a relevância dos PPARs para a homeostasia e que, em especial, o PPARγ exerce efeito anti-inflamatório, que entre outros efeitos media a eferocitose. Apesar da literatura ser abundante, os mecanismos de ação dos PPAR ainda não são totalmente conhecidos.

2 OBJETIVOS

Com base nos dados obtidos preliminarmente em nosso laboratório, o objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos de ação da ANXA1 sobre a expressão de PPARγ em macrófagos, e se esta modulação ocorre em neutrófilos, linfócitos e tecido adiposo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c, machos, adultos, peso entre 25-35 g, com idade de 6-8 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Adicionalmente, foram empregados camundongos Balb/C machos nocautes para o gene de Anexina A1 ($ANXA1^{-/-}$), gerados a partir de matrizes gentilmente cedidas pelo Dr. Mauro Perretti (William Harvey Research Instititute of London). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em salas com controle de temperatura (22-25ºC), umidade constante (60%) e ciclos controlados (claro/escuro, 12 horas cada), tendo ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Número do processo 461.

Os fármacos quetamina e xilasina na proporção 10:1 (77/7mg/kg) foram administrados via subcutânea antes de cada procedimento experimental e suplementado nas doses de 7/0,7mg/kg, sempre que necessário.

3.2 Obtenção das células e tecido

Neutrófilos foram obtidos após injeção i.p. de glicogênio de ostra 1% (Sigma-Aldrich, código), 3 mL, em camundongos Balb/c WT ou $ANXA1^{-/-}$. Após 4h, os animais foram anestesiados como descrito acima, a cavidade peritoneal foi lavada com PBS estéril e as células coletadas com auxílio de pipeta Pasteur foram centrifugadas (10 min, 600 g, 4°C), e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, BR).

Macrófagos foram obtidos após injeção i.p. de tioglicolato de sódio 4% (Sigma-Aldrich, B2551), 3 mL, em camundongos Balb/c WT ou $ANXA1^{-/-}$. Após 5 dias (120 horas), os animais foram anestesiados, a cavidade peritoneal foi lavada com PBS estéril e as células, após centrifugação (10 min, 600 g, 4°C), foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, BR).

Linfócitos foram obtidos do macerado de baço de camundongos Balb/c WT ou

ANXA1$^{-/-}$. A maceração foi feita com o auxílio de um cilindro contra um uma malha (*cell strainer* de 100µM de porosidade – BD Biosciences) e meio RPMI 1640 com 10% de soro feral bovino (SFB, Vitrocell) (meio R10). A suspensão celular foi lisada com tampão de lise (NH4Cl, 0,15 M; KHCO3, 10 Mm e EDTA, 0,1 mM, Sigma Aldrich) e centrifugada (10 min, 600 g, 4°C), lavada, filtrada em gaze estéril para a retirada de restos teciduais e centrifugada novamente. Linfócitos T foram isolado utilizando suspensão Ficoll qual Ficoll e de onde foi obtido. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, BR).

Tecido adiposo epididimal foi de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$. O tecido foi lisado em dispersor Ultra Turrax T18 (IKA) com tampão RIPA (PBS, deoxicolato de sódio, Triton-x 100 e SDS (dodecil sulfato de sódio (Synth)) contendo coquetel inibidor de proteases e PMSF (fenilmetilsulfonilflúor, 1 µM, Amresco) na proporção de 1g tecido/3mL de tampão RIPA. O homogenato obtido foi centrifugado (30s, 400 g, temperatura ambiente).

3.3 Tratamentos

Para a realização dos ensaios foram utilizados os seguintes tratamentos: 1) Veículo (0,033% DMSO), 2) ligantes de PPAR pan LYSO-7 (10 µM; Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco–GPIT/UFPE) e Bezafibrato (10µM, All Chemistry, São Paulo, SP - Brasil), 3) agonista PPARγ Pioglitazona (10µM, BD Biosciences), 4) antagonisa do receptor FPR2, WRW4 (10µM, Tocris), 6) rANXA1 (100 nM, doado pela professora Dra. Egle Solito - Queen Mary University of London); 7) inibidor de síntese proteica, Cicloheximida (10 µM, Sigma Aldrich).

As células e tecidos foram obtidas conforme a metodologia descrita anteriormente e tratadas de acordo com diferentes protocolos experimentais, descritos a seguir:

1) Neutrófilos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$(3x10^{6} células/poço) foram tratados com LYSO-7 (10 µM), bezafibrato (10 µM) ou pioglitazona (10 µM), por 2 h, em meio R10 (RPMI acrescido de 10% de SFB, Vitrocell, Campinas, SP, BR), a 37ºC, 5% de CO_2. As células foram coletadas, lavadas e o *pellet* utilizado para a expressão

proteica de PPARγ por Western Blot.

2) Macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$ (3x10^{6} células/tubo) foram pré-tratados ou não com CHX (cicloheximida) por 1 h, rANXA1 (100nM) por 1 h ou WRW4 (10 µM) por 4 h e tratados ou não com LYSO-7 (10 µM) por 2 h, bezafibrato (10 µM) por 2 h ou pioglitazona (10 µM) por 2 h. As células foram coletadas, lavadas e o *pellet* utilizado para a expressão proteica de PPARγ, CREB, p-CREB (fosfo-CREB), STAT6 ou p-STAT6 (fosfo-STAT6) por Western Blot.

3) Linfócitos foram tratados (1x10^{7} células/tubo) com veículo, bezafibrato (10 µM) ou LYSO-7 (10 µM) por 2 h a 37ºC, em 5% CO_2. As células foram coletadas, lavadas e o *pellet* utilizado para a expressão proteica de PPARγ por Western Blot.

3.4 Ensaio de Western Blot para quantificação de PPARγ

O homogenato celular foi obtido utilizando tampão RIPA contendo coquetel inibidor de proteases e PMSF (fenilmetilsulfonilflúor, 1µM, Amresco). As proteínas do homogenato celular (50 µg/poço) foram separadas utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%, Bio-Rad) a 130V, de acordo com Laemmli (1970), e transferidas eletroforeticamente para membranas de PVDF (fluoreto de polividine, Millipore) por 1,5 h a 400mA.

Os sítios inespecíficos foram bloqueados com leite seco desnatado 5% em TBS-t (PBS e Tween-20) e as membranas incubadas *overnight* com anticorpo primário contra PPARγ (1:1000) (1µg/mL, Abcam).

As membranas foram lavadas com tampão TBS-t e incubadas 2 h com anticorpo secundário anti-rabbit (1:3000; GE Healthcare). Ensaio de quimioluminescência (HRP SuperSignalWestPico; Pierce) foi utilizado para detectar as bandas imunorreativas. As intensidades das bandas foram estimadas por análise de densitometria e foram comparadas com a intensidade da expressão de β-actina.

3.5 Expressão gênica de PPARγ em macrófagos

A transcrição de RNAm foi quantificada em macrófagos tratados com veículo, Bezafibrato (10µM), Pioglitazona (10µM) ou LYSO-7 (10µM) por PCR-real time (RT-PCR). As amostras foram estocadas a -80ºC em tubos livres de RNA e em solução

de Trizol (Life Technolgies). As amostras foram homogeneizadas por centrifugação e então digeridas com proteinase K (200µg/mL em solução de lise, Thermo Scientific), por 12 h a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 1 g por 5 minutos, e a fase aquosa contendo RNA foi separada. A extração total de RNA foi realizada com ABI PRISM 6100 ácido nucleico prepstation (Appplied Biosystem). O RNA foi seco utilizando um secador UNIVAPO 100H (UniEquip). Subsequentemente, o RNA foi dissolvido em água livre de RNA (água DEPC) para quantificação de RNA (ND-420, Nanodrop Technology). A precisão da qualidade do ácido nucleico foi avaliada pela diferença da relação A260/A280 em NanoDrop 2000. Dez microlitros de RNA total foram utilizados para a reação de RT, seguindo o protocolo do fabricante (kit High Capacity cDNA Archive, Applied Biosystems). O cDNA foi então amplificado por PCR-real time em tempo real. A mistura de reação contendo TaqMan DNA polimerase (® TaqMan Universal PCR Master Mix 2X) (F: AAGAGCTGACCCAATGGTTG e R: TGAGGCCTGTTGTAGAGCTG). O PCR em tempo real foi realizado ocorreu em equipamento PRISM 7000 Sequence Detection System ABI (Applied Biosystems).

3.6 Expressão proteica dos fatores de transcrição STAT6, p-STAT6, CREB ou p-CREB em macrófagos por Western Blot

Macrófagos foram obtidos de acordo com o descrito no item 3.2. A suspensão celular de $3x10^6$/tubo foi incubada com veículo ou LYSO-7 (10 µM) durante 2 h, a 37ºC a 5% CO_2. As células foram coletadas, lavadas e o *pellet* utilizado para a expressão proteica de PPARγ por Western Blot.

Western Blot foi realizado de acordo com citado anteriormente, utilizando-se anticorpo anti-STAT6 (1:1000, Abcam), p-STAT6 (1:1000, Abcam), CREB (1:1000, Cell Signaling) ou p-CREB (1:1000, Cell Signaling), *overnight*.

3.7 Viabilidade celular

Neutrófilos foram obtidos conforme descrito no item 3.2 A suspensão celular de $3x10^6$/poço foi incubada durante 6h, 24h ou 48h, a 37ºC com 5% CO_2. A viabilidade dos neutrófilos foi determinada por ensaio de citometria de fluxo, usando

marcação com a proteína Anexina V (2,5 µL:100 µL de tampão de ligação de anexina – conjugada com APC, BD Biosciences) e iodeto de propídio (PI) (50 µg/mL, Sigma Aldrich), para mensurar apoptose e necrose, respectivamente. Os tubos foram incubados durante 30 minutos, a 4ºC e as amostras foram mensuradas em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences). Imediatamente após a análise, os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, permitindo a leitura computadorizada (Macintosh Apple) pelo software Flow Jo versão os dados de 10.000 células foram obtidos sendo somente considerados os leucócitos com morfologia viável para a análise.

Neutrófilos foram obtidos de acordo com o item 3.2. A suspensão celular de $3x10^6$/poço foi incubada com veículo, Bezafibrato ou LYSO-7 durante 2 h a 37ºC com 5% CO^2. Em seguida, neutrófilos foram incubados com Ly6G (PE; 1,5:100µL; BD Biosciences) para confirmar a pureza da preparação, com Anexina V (APC; 2,5:100µL em tampão de ligação para anexina; BD Biosciences) ou com CXCR4 (FITC; 1,5:100µL; BD Biosciences), para mensurar a porcentagem de células em apoptose ou senescência, respectivamente. Os tubos foram incubados durante 1 h a 5ºC. Em seguida foi realizada leitura em citômetro de fluxo (FACS Canto II, BD Biosciences). Imediatamente após a análise, os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, permitindo a leitura computadorizada (Macintosh Apple) pelo software Flow Jo. Os dados de 10.000 células foram obtidos, sendo somente considerados os leucócitos com morfologia viável para a análise.

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos estão apresentados como média ± erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguida do teste de Tukey-Kramer, quando necessário, utilizando o software estatístico GraphPadPrism 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos da ANXA1 sobre a expressão proteica de PPARγ em macrófagos

Como já descrito anteriormente, nós mostramos que macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$ apresentam concentrações menores de PPARγ, e que o aumento de sua expressão induzido pelo agonista PPAR pan (LYSO-7) em macrófagos de animais WT, não foi observado em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$ (Santin et al., 2013a). A Lyso-7 foi empregada neste estudo, uma vez que é o único agonista PPAR pan da classe das tiazolidinedionas, que atua sobre os 3 receptores e, ainda, é um inibidor da COX-2 (Santin et al, 2013a). Nosso grupo de pesquisa tem se envolvido na caracterização do efeito anti-inflamatório desta molécula, mostrando que a administração oral desta inibe o desenvolvimento do lesão gástrica aguda, por inibir a migração de neutrófilos para a área lesada e a produção de NO pela ação da óxido nítrico induzível (Santin et al, 2013b). Ademais, a LYSO-7 aumenta a cicatrização no processo de lesão gástrica crônica (Santin et al., comunicação pessoal). Este último dado nos levou a investigar os mecanismos de ação da LYSO-7 na resolução da inflamação e observamos, como descrito acima, que seu efeito é mediado, pelo menos em parte, pela expressão de PPARγ em macrófagos, o que não ocorre em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-.}$

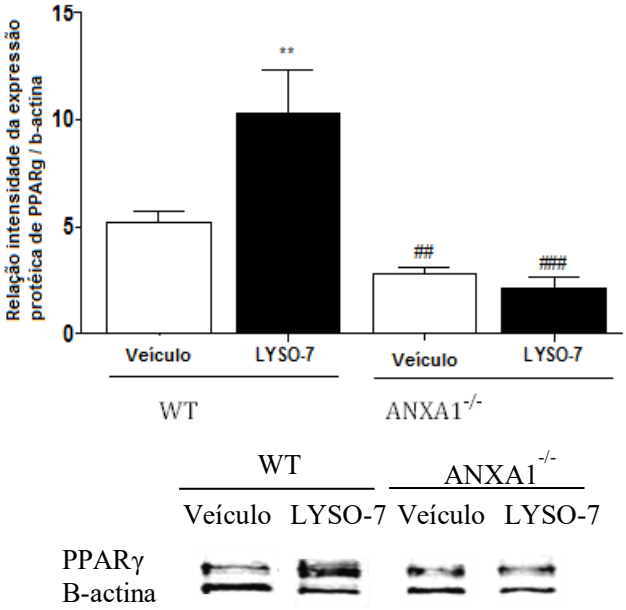
No sentido de confirmar este efeito, empregamos mais dois ligantes de PPAR, já reconhecidos na literatura. O bezafibrato é um agonista pan da classe dos fibratos, conhecido por reduzir os níveis de triglicérides e LDL e aumentar HDL no sangue; aumentar a lipólise, reduzir a produção do inibidor de lipase lipoproteica ApoCIII, ativar a lipase lipoproteica e a ApoAV (YKI-JÄRVINEN, 2004 GOLDENBERG et al., 2008). Ainda, o bezafibrato promove a β-oxidação de ácidos graxos, inibindo, assim, a síntese de triglicéridos por reduzir a disponibilidade de ácidos graxos livres (HAUBENWALLNER et al., 1995; SCHOONJANS et al., 1996a; SCHOONJANS et al., 1996; STAEL et al., 1998; BERGER & MOLLER, 2002; CHAPMAN, 2006). A pioglitazona é um agonista PPARγ, que pertence à classe das tiazolidinedionas, e utilizada para o tratamento de diabetes, por aumentar a sensibilidade à insulina (KEMNITZ et al., 1994; ORASANU et al., 2008). Ademais, a pioglitazona altera a concentração plasmática de lipídeos, como o LDL, e promove aumento da função ovulatória e da fertilidade em mulheres que apresentam ovário policístico (SOOD et

al., 2000; PARULKAR et al., 2001). Esta também vem sendo estudada por seus efeitos anti-inflamatórios em diversos modelos experimentais de aterosclerose, lesões vasculares e doença de Parkinson (ORASANU et al, 2008; HAMBLIN et al., 2011; SWANSON et al., 2011).

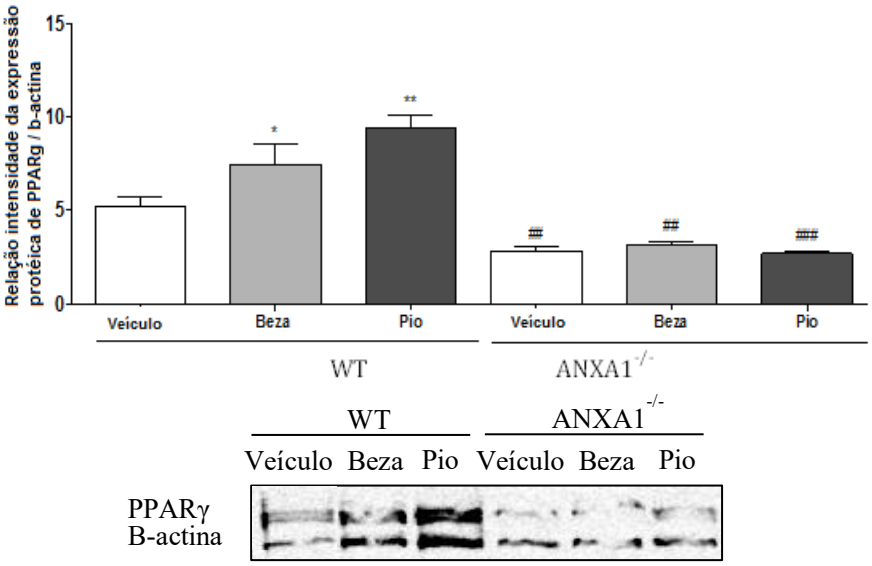
Os dados por nós obtidos mostram que o tratamento com bezafibrato ou pioglitazona, a exemplo do tratamento com Lyso-7, aumentou a expressão proteica de PPARγ em macrófagos de animais WT, mas não em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$ (Figura 1). Desta forma, mostramos que os ligantes de PPAR, independente de sua classe química e afinidade pelos receptores PPAR, induzem a expressão de PPARγ em macrófagos. Este dado corrobora os efeitos dos ligantes de PPAR em outros tecidos, como o tecido gástrico (SANTIN et al., 2013b), tecido adiposo (LARSEN et al., 2003), linfócitos T (HARRIS & PHIPPS, 2001). É interessante salientar que a expressão constitutiva de PPARγ se manteve reduzida em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$ quando tratados com bezafibrato ou pioglitazona (Figura 1), da mesma foram que ocorreu após o tratamento com LYSO-7

Figura 1. Efeitos dos tratamentos com Lyso-7, bezafibrato ou pioglitazona sobre a expressão proteica de PPARγ em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

A)



B)

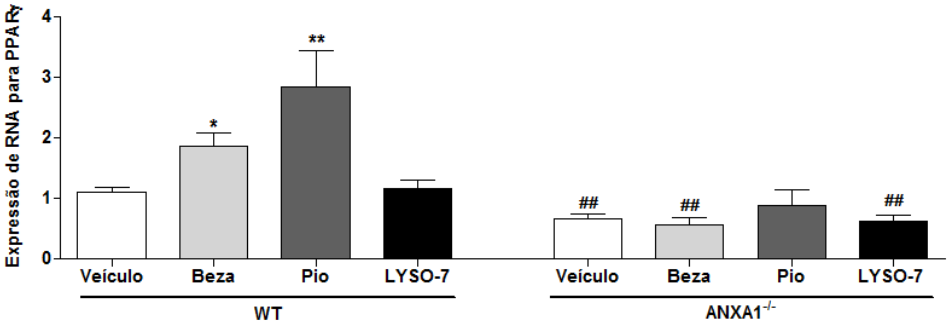


Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ (solução de tioglicolato de sódio 4%, 120 hs) foram tratados com A) veículo (DMSO+R10), LYSO-7 (10 µM) B) veículo (DMSO+R10), bezafibrato (10 µM) ou pioglitazona, (10 µM) por 2 h. A expressão de PPARγ for obtida por Western Blot e suas concentrações foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer.*$p<0,05$ vs WT veículo, **$p<0,01$ vs WT veículo, $^{\#\#}p<0,01$ e $^{\#\#\#}p<0,001$ vs respectivo WT.

4.2 Efeitos da ANXA1 sobre a expressão gênica de PPARγ em macrófagos

A partir dos dados obtidos anteriormente, que mostraram que a ANXA1 poderia modular a expressão proteica de PPARγ em macrófagos, investigamos se esta modulação poderia ocorrer via transcripcional. Os resultados apresentados na Figura 2 mostram níveis reduzidos de RNAm de PPARγ em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$ em comparação a macrófagos de animais WT. O tratamento dos macrófagos de animais WT com bezafibrato ou pioglitazona aumentou os níveis de RNAm para PPAR em macrófagos de WT, mas não de macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$. Em conjunto, os dados mostram, pela primeira vez, que a ANXA1 controla a expressão gênica de PPARγ. Interessantemente, o tratamento dos macrófagos de animais WT com LYSO-7 não alterou os níveis de RNAm para PPARγ (Figura 2). Uma vez que observamos aumento da expressão proteica de PPARγ após tratamento com LYSO-7, a indução da expressão gênica de PPAR pelo LYSO-7 está sendo confirmada. É importante ressaltar que ainda não há dados na literatura que demonstrem que a ANXA1 controla a expressão de PPARγ, e nem de outros receptores nucleares, ampliando perspectivas para uma possível modulação e o estudo de possíveis novas estratégias terapêuticas.

Figura 2. Efeitos dos tratamentos com Lyso-7, bezafibrato ou pioglitazona sobre a expressão gênica de PPARγ em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$



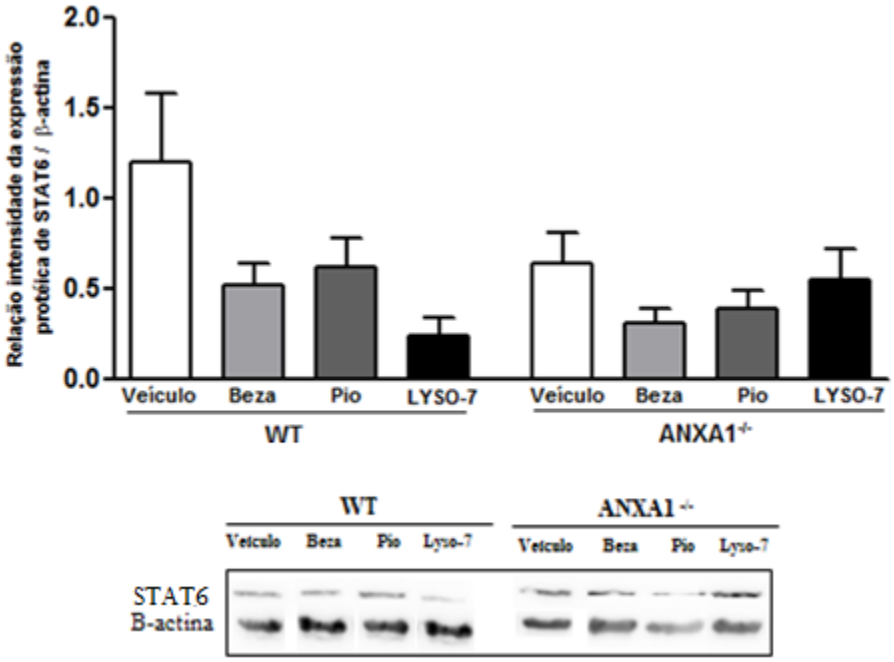
A expressão gênica de PPARγ em macrófagos de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ (solução de tioglicolato de sódio 4%, 120 hs) foi realizada por ensaio de RT-PCR. Os macrófagos peritoneais (solução de tioglicolato 4%, 120hs), foram tratados com veículo, bezafibrato (10 µM), pioglitazona (10 µM) ou LYSO-7 (10 µM), por 2 h. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer.*$p<0,05$ vs respectivo veículo; **$p<0,001$ vs respectivo veículo; $^{\#}p<0,05$ vs WT veículo e $^{\#\#}p<0,01$ vs respectivo WT.

4.3 Influencia da ANXA1 sobre a expressão de STAT6 e p-STAT6 em macrófagos

A família de proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STAT) exerce papel crucial como mediadores da sinalização de citocinas, sendo um fator importante na imunidade humoral (HOU et al., 1994; GOENKA & KAPLAN, 2011). O STAT6 é um dos membros desta família, composta por 7 membros, sendo ativado principalmente por IL-4 e IL-13 (HOU et al., 1994; GOENKA & KAPLAN, 2011). Este se encontra no citoplasma e uma vez ativado, pela fosforilação, forma homodímeros e se transloca para o núcleo, onde se liga diretamente ao DNA, no seu domínio DNA-ligante, regulando assim o processo de transcrição gênica (MIKITA et al., 1996; GOENKA & KAPLAN, 2011). Além de estar presente em células T e B, STAT6 é encontrado em macrófagos, e uma vez estimulada com IL-4, induz a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2, e pode induzir também a expressão de MHC II na presença de IL-13 (TAKEDA et al., 1996; MOSSER et al., 2008; MARTINEZ et al., 2009; GOENKA & KAPLAN, 2011). Ainda, a literatura mostra que a expressão gênica de PPARγ é mediada pela STAT6, onde a STAT6 atua facilitando a ligação do PPARγ ao sítio de ligação no DNA, ligando-se aos PPREs, além de também ser fator importante para diversos genes codificados pelo PPARγ via IL-4 (WELCH et al., 2003; BERRY et al., 2007; SZANTO et al., 2010; GOENKA & KAPLAN, 2011). De fato, SZANTO e colaboradores (2010) demonstraram que o STAT6 pode aumentar a atividade do PPARγ, melhorando a interação deste com os genes transcritos pelo mesmo. Desta forma, investigamos as concentrações de STAT6 em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$ (Figura 3), e os resultados obtidos mostram que não houve diferença significativa na expressão dos níveis proteicos de STAT6 em macrófagos de animais WT e ANXA1$^{-/-}$, mesmo após os tratamentos com bezafibrato, pioglitazona ou LYSO-7. Porém pode-se observar uma tendência de menor expressão de STAT6 em macrófagos de animais WT tratados com os ligantes de PPAR, e em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$. Estes ensaios estão sendo realizados mais uma vez para confirmamos os valores de STAT6 em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$. Vale ressaltar que o possível controle da ANXA1 sobre STAT6 é mostrado aqui pela primeira vez. Somente PUPJALIS e colaboradores (2011) mostraram que o peptídeo Ac2-26, que mimetiza a porção N-terminal da ANXA1, reduziu a sinalização da IL-6 e a secreção de TNF-α por

monócitos ativados pelo LPS, via ativação de STAT3. Foram realizados também ensaios para verificar a expressão de p-STAT6 (fosfo-STAT6). Os resultados obtidos mostraram que a p-STAT6 foi indetectável nestas condições.

Figura 3. Expressão proteica de STAT6 em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$



Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ (solução de tioglicolato de sódio 4%, 120 hs) foram com veículo (DMSO + R10) ou com LYSO-7 (10 µM) por 2 h. A expressão de STAT6 foi obtida por de Western Blot e os seus níveis foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer.

4.4 Influencia da ANXA1 sobre a expressão de CREB e p-CREB em macrófagos

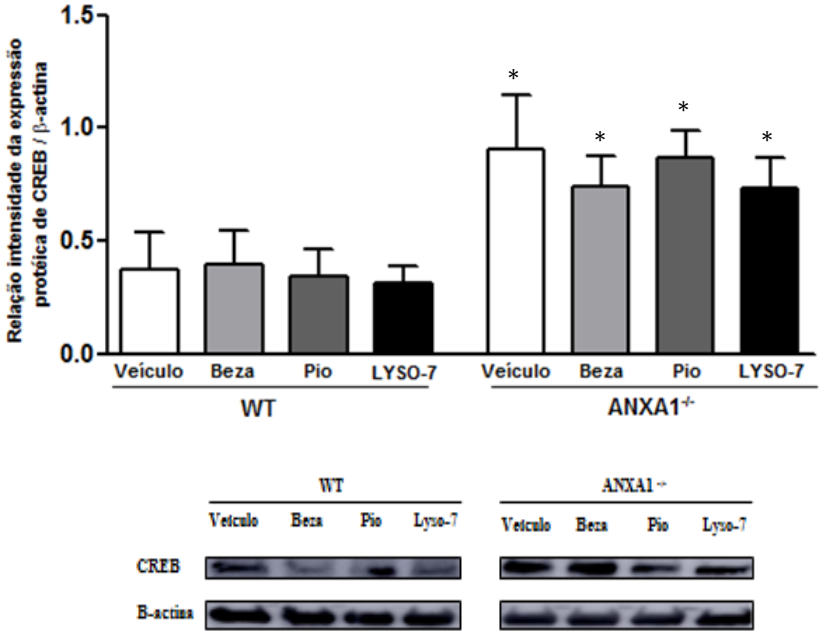
Várias evidências *in vitro* mostram uma co-relação positiva entre a ativação de PPARγ e o fator de transcrição *cAMP response element binding protein (*CREB), sendo que a ativação PPARγ em células do sistema nervoso central (CHIANG ET AL., 2014; SINGH ET AL., 2015; MAKELA ET AL., 2016; CHIANG ET AL., 2016) e endotelial (SCODITTI et al., 2010) leva a ativação de CREB. Ainda, HERZIG et al. (2003) demonstraram que animais deficientes do fator de transcrição CREB apresentaram aumento da expressão de PPARγ hepático, mostrando que CREB atua como inibidor da expressão de PPARγ. Adicionalmente, o tratamento de linhagem de endotélio humano com ligantes de PPARγ inibiu a expressão de COX-2 mediada por CREB (SCODITTI et al., 2010), reforçando a interrelação de PPARγ e CREB. Ademais, há relatos na literatura da relação entre ANXA1 e CREB, uma vez que o gene que codifica ANXA1 contém elemento responsivo ao cAMP (CRE), onde CREB e p38 MAPK são requeridos para a síntese de ANXA1 (ANTONICELLI et al., 2001; CASTRO-CALDAS et al., 2003).

O CREB localiza-se no núcleo e é crucial para o acoplamento transcripcional, que ocorre pelas alterações na membrana celular, levando à modificações na expressão gênica (CARLEZON et al., 2005). Em macrófagos, CREB parece ativar a sinalização de sobrevivência via LPS/TLR4, tornando-os anti-apoptóticos pela ativação de dois genes anti-apoptóticos (PAI-2 – inibidor de ativador de plasminogênio-2 e Bfl/A1 – também conhecido com A1 ou GRS), via NF-kB e p38 MAPK, que leva à ativação de mitógenos e proteínas quinase como MSK1 e MSK2, levando à manutenção da responsividade imune (HSU et al., 2004; 18,19; PARK et al., 2005).

Pelos motivos citados acima, avaliamos se a ANXA1 e a ativação de PPARs modulam a expressão de CREB. Os resultados, mostrados nas Figuras 4 e 5 demonstram que a expressão de CREB na forma nativa encontra-se aumentada em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$, tanto em condições basais quanto de tratamento com os ligantes de PPAR em relação à expressão de animais selvagens. Apenas tendência de aumento de expressão da forma fosforilada de CREB foi observada em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$. Estes dados são inéditos na literatura, e pela primeira vez mostramaos que a ANXA1 endógena é um fator importante para

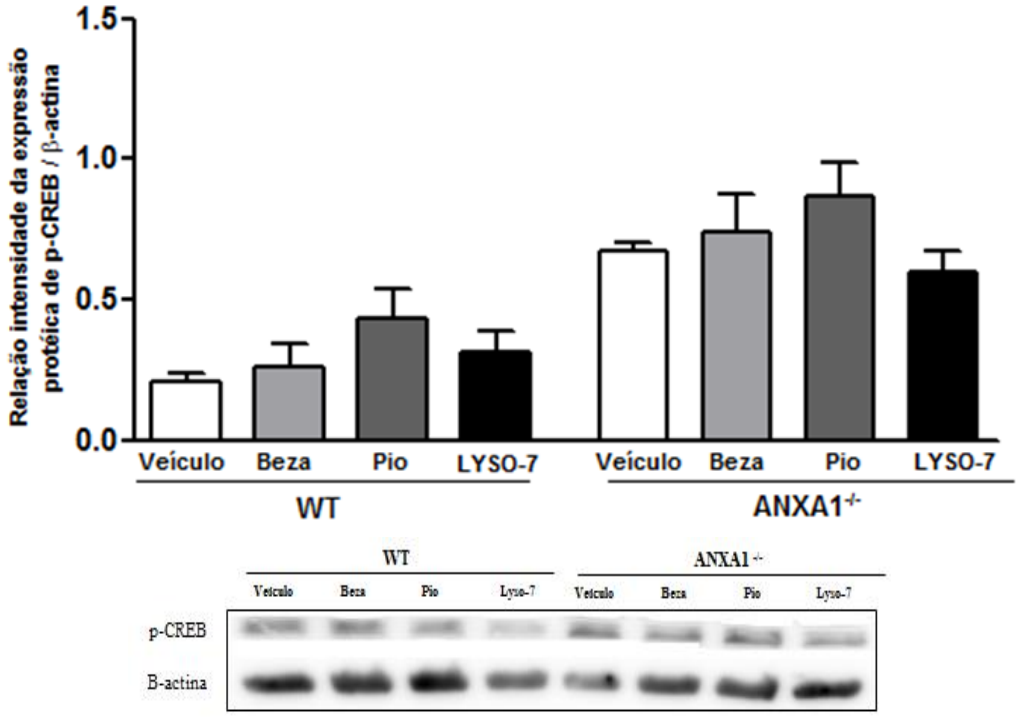
manutenção dos níveis homeostáticos de CREB intracelular. É possível que os níveis aumentados de CREB, associados a uma tendência de redução de STAT6, pode ser o responsável pela menor expressão de PPARγ em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$

Figura 4. Expressão proteica de CREB em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$



Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ (solução de tioglicolato de sódio 4%, 120 hs) foram com veículo (DMSO + R10) ou com LYSO-7 (10 µM) por 2 h. A expressão de CREB for obtida por de Western Blot e os seus níveis foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer. Estatística – diferença *P<0,05 vs respectivos valores em WT

Figura 5. Expressão proteica de p-CREB em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$

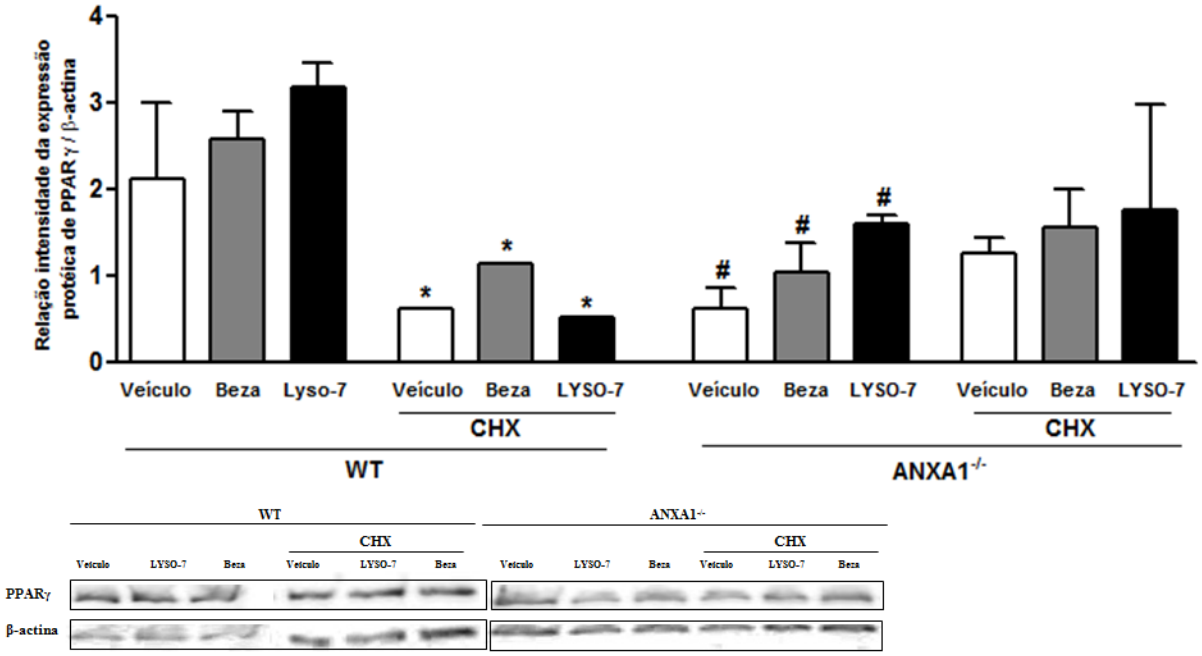


Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ (solução de tioglicolato de sódio 4%, 120 hs) foram com veículo (DMSO + R10) ou com LYSO-7 (10 µM) por 2 h. A expressão de p-CREB for obtida por de Western Blot e os seus níveis foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer.

4.5 Papel da ANXA1 sobre a síntese de PPARγ

No sentido de complementarmos as investigações sobre os mecanismos de ação da ANXA1 sobre a expressão de PPARγ, empregamos uma estratégia farmacológica para o bloqueio da síntese proteica. A cicloheximida (CHX) é um dos bloqueadores de síntese protéica mais utilizados em experimentos laboratoriais (ROSENTHAL & FURNARI, 1957; SCHNEIDER-POETSCH et al., 2010; OKSVOLD et al., 2012; GERASHCHENKO & GLADYSHEV, 2014; GARREAU DE LOUBRESSE et al., 2014), pois é capaz de bloquear ao ribossomo e impedir a fase de alongamento, inibindo a eEF2 (fator de alongamento-2), da síntese protéica (OBRIG et al., 1971; SCHNEIDER-POETSCH et al., 2010). Assim, os macrófagos de animais selvagens ou ANXA1$^{-/-}$ foram tratados com CHX (10µM, 2 h) e, subsequentemente, tratados com ligantes de PPAR bezafibrato ou LYSO-7. Pode-se verificar, pelos resultados apresentados abaixo na Figura 8, que o tratamento com CHX inibiu a síntese de PPARγ em macrófagos de animais selvagens em condições basais (veículo) ou após tratamentos com os ligantes de PPAR (Figura 6). Por outro lado, a expressão reduzida de PPARγ se manteve em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$. Assim, os resultados aqui obtidos corroboram que os ligantes de PPAR induzem a síntese protéica de PPARγ e que a ANXA1 modula este processo.

Figura 6. Efeitos do tratamento com cicloheximida sobre a expressão proteica de PPARγ em macrófagos de animais selvagens e ANXA1$^{-/-}$



Macrófagos de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ (solução de tioglicolato de sódio 4%, 120 hs) foram obtidos, tratados ou não ($3x10^6$ células/tubo) com CHX (10 µM) por 1 h, seguido de tratamento com bezafibrato (10 µM), pioglitazona (10 µM) ou LYSO-7 (10 µM) por 2 h. A expressão de PPARγ for obtida por ensaio de Western Blot e os seus níveis foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer. *$p<0,05$ vs WT veículo, $^{\#}p<0,05$ vs WT veículo.

4.6 Participação do receptor FPR2 no controle da ANXA1 sobre a expressão de PPARγ em macrófagos

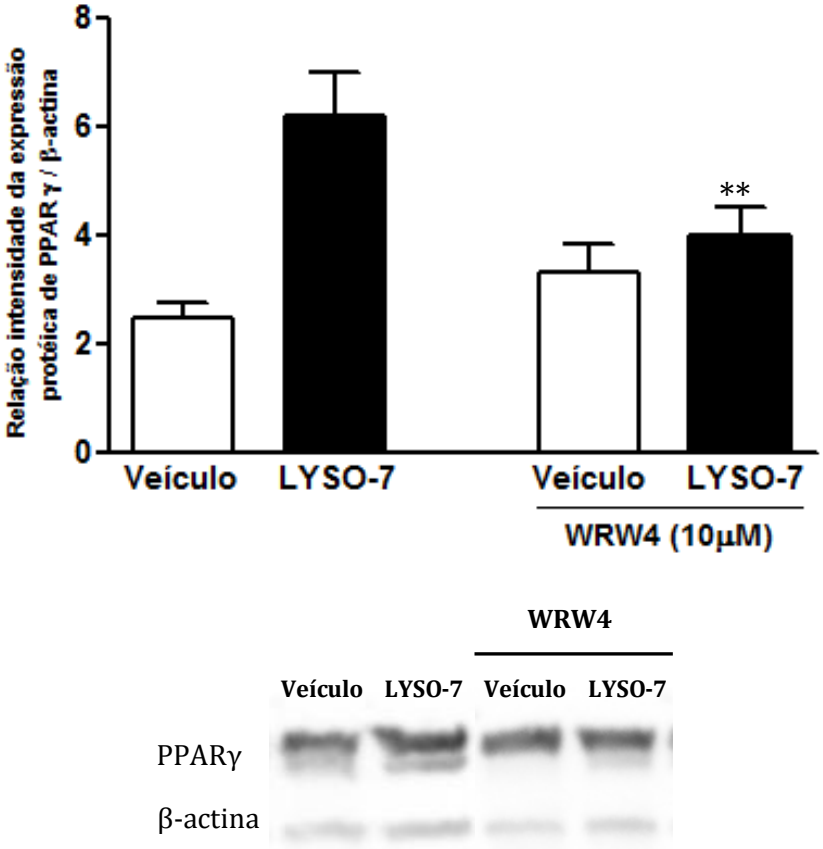
Como salientado na Introdução, o FPR2, um receptor transmembrana acoplado à protepina G inibitória (Gi), é expresso em diversos tipos celulares, incluindo os macrófagos (PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009), podendo apresentar vários ligantes, como proteínas, lipídios e peptídeos, como ANXA1, LXA4, ATL (*aspirin triggered lipoxin*) gerando uma gama de diversidade de sinais biológicos (CHIANG et al., 2006; COORAY et al., 2013; SERHAN et al., 2008). Uma das ações mais conhecidas do FPR2 é sua ação pró-resolutiva e anti-inflamatória quando ocorre a ligação com a ANXA1 ou a lipoxina A4 (LXA4), induzindo a apoptose de neutrófilos, fagocitose dos neutrófilos apoptóticos por macrófagos e a subsequente eferocitose, processo no qual os macrófagos que fagocitaram neutrófilos apoptóticos ou debris sofrem apoptose (COORAY et al., 2013; CHIANG et al., 2006; SERHAN et al., 2008). Dufton et al. (2010) demonstraram em modelos de inflamação em murinos deficientes de FPR2 ($FPR2^{-/-}$) ocorre aumento da aderência ao endotélio e migração de células inflamatórias para o foco da inflamação. HAYHOE et al. (2006) demonstraram que a ANXA1, assim como o peptídeo Ac2-26 são capazes de controlar positivamente a ativação do receptor FPR2 na superfície de leucócitos polimorfonucleares (PMN), e que a ligação de Ac2-26 ou ANXA1 ao FPR2 de PMN reduz sua adesão na camada endotelial de vénulas pós-capilares.

Desta forma, consideramos relevante investigar a participação deste receptor no controle exercido pela ANXA1 na expressão de PPARγ em macrófagos. Para tanto, empregamos o antagonista específico do FPR2, o WRW4 para tratar macrófagos de animais WT. Os resultados obtidos mostraram que o bloqueio do FPR2 não reduziu a expressão basal de PPARγ, mas reduziu a expressão estimulada pela LYSO-7 (Figura 7). Desta forma, resultados mostram que a modulação da ANXA1 sobre a expressão de PPARγ em condições de estimulação por um ligante PPAR pan ocorre via FPR2.

A literatura, embora mostre que o WRW4 seja um antagonista FPR2, não é consensual sobre a especificidade do receptor, sendo também relatado ser antagonista do receptor FPR3 (BAE et al., 2004; SEIDEL et al., 2012; LEONI et al., 2013). Ainda, os resultados de GAVINS et al. (2003) sugerem que tanto FPR1 e FPR2 parecem estar envolvidos na resposta da ANXA1, porém o FPR2 estaria mais

envolvido no desacoplamento de leucócitos do endotélio. KHAU et al., (2011) mostraram que em células de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, a ANXA1 é capaz de interagir tanto com o FPR2 quanto com o FPR1. Os resultados obtidos por GEARY et al. (2014) utilizando ANXA1 endógena ou recombinante em células de adenocarcinoma de próstrata, mostraram que a proteína se liga especificamente aos FPR2, porém também com 30% de atividade seletiva para o FPR1, e ensaio realizado com a porção bioativa, o peptídeo Ac2-26, mostrou ter afinidade por todos os membros da família do FPR: FPR1, FPR2 e FPR3.

Figura 7. Efeito do WRW4 sobre a expressão proteica de PPARγ em macrófagos de animais WT ou ANXA$^{-/-}$



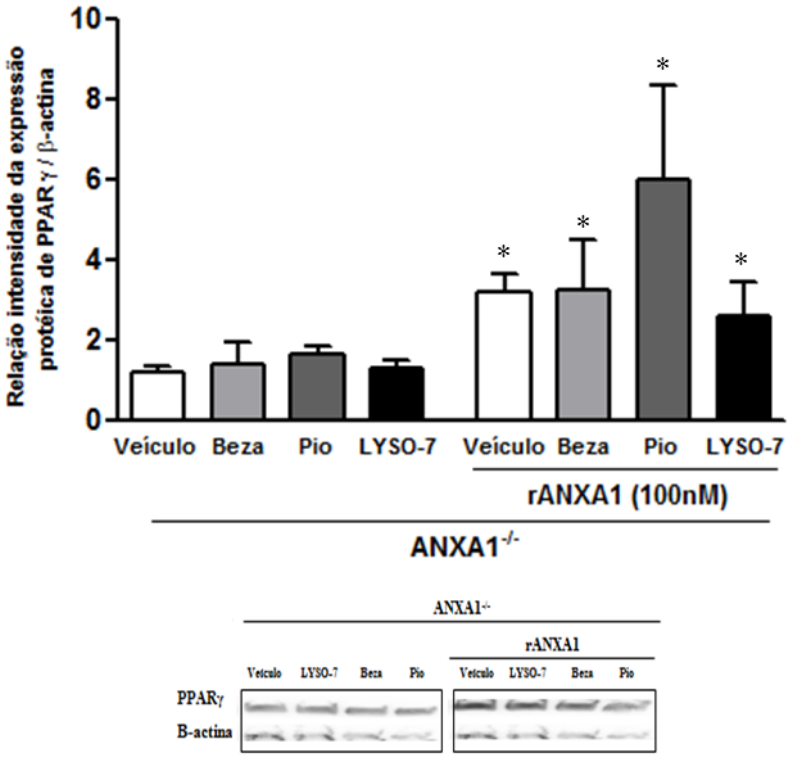
Expressão proteica de PPARγ em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c WT (solução de tioglicolato de sódio 4%, 120 hs), baseado na relação de intensidade de expressão de PPARγ/intensidade de expressão de β-actina. Os macrófagos foram tratados com veículo (DMSO + R10) ou com WRW4 (10 μM) por 4 horas e posteriormente com veículo (DMSO + R10) ou LYSO-7 (10μM) por 2 h. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer;**p>0,01 vs respectivo WT.

4.7 Efeito da ANXA1 recombinante sobre a expressão de PPARγ em macrófagos

No sentido de confirmarmos a participação da ANXA1 na expressão de PPARγ em macrófagos, estas células, obtidas tanto de animais WT como ANXA1$^{-/-}$, foram tratadas com a proteína recombinante da ANXA1 (rANXA1). O pré-tratamento com ANXA1 recombinante por 1 hora antes das incubações com LYSO-7 ou pioglitazona, aumentou a expressão do PPARγ em animais WT, mostrando, de fato, o papel da ANXA1 no controle da expressão deste receptor. Ainda, a reposição de ANXA1 em macrófagos de animais deficientes desta proteína reestabeleceu os níveis proteicos de PPARγ em macrófagos tratados ou não com os ligantes de PPAR γ (Figura 10).

É importante ressaltar que a reposição da ANXA1 recombinante tem sido uma estratégia experimental importante nos estudos que envolvem animais geneticamente deficientes, e os protocolos aqui empregados foram baseados nos descritos pela literatura (PATEL et al., 2012; CRISTANTE et al., 2013; LOCATELLI, 2014). Neste sentido, tem sido mostrado que a rANXA1 tem efeitos anti-inflamatórios em neutrófilos (PERRETTI & FLOWER, 2004), pois inibe a quimiotaxia (WALTHER et al., 2000), adesão (ZOUKI et al., 2000) e transmigração de PMN pela monocamada endotelial (PERRETTI et al., 1996), e acelera o processo de apoptose (SOLITO et al., 2003b). Já em macrófagos, a rANXA1 recuperou a atividade fagocítica de macrófagos da medula óssea em fagocitar neutrófilos apoptóticos (DALLI et al., 2012) e inibiu a polarização para o fenótipo M1 estimulando a polarização para o fenótipo M2 (LOCATELLI et al., 2014).

Figura 8. Efeito da rANXA1 sobre a expressão proteica de PPARγ em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$



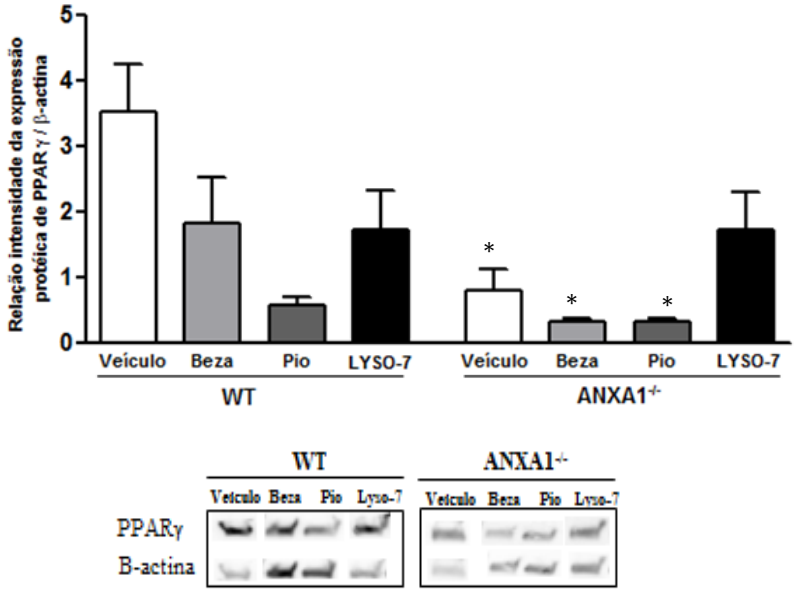
Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c ANXA1$^{-/-}$ (solução de tioglicolato de sódio 4%, 120 hs) foram pré-tratados com ANXA1 (100nM) por 1 h, e após, com veículo (DMSO + R10) com bezafibrato (10 µM), pioglitazona (10 µM) ou LYSO-7 (10 µM) por 2 h. A expressão de PPARγ for obtida por de Western Blot e os seus níveis foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de macrófagos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer. *P<0,05 vs respectivos valores sem tratamento com rANXA1

4.8 Efeitos da ANXA1 sobre a expressão proteica de PPARγ em neutrófilos

Os neutrófilos desempenham importante função durante o processo inflamatório, atuando como fagócitos e secretores (SERHAN, 2007), e como já descrito na Introdução desta Dissertação, a ANXA1 pode ser encontrada em grânulos de gelatinase destas células e os efeitos da ANXA1 endógena ou exógena sobre neutrófilos tem sido amplamente demonstrada, em especial no controle da interação dos neutrófilos com o endotélio vascular e da apoptose. Assim, a ANXA1 modula a clivagem de L-selectina de neutrófilos na fase inicial da interação com o endotélio microvascular da área inflamada (SOLITO et al., 2003b) e induz a apoptose de neutrófilos no sítio de lesão, pela ativação de caspase-3 e inibição de Mcl-1, ERK1/2 e Nfk-B (SOLITO et al., 2003b; VAGO et al., 2012; PERRETTI, 2012; EL KLEBIR & FILEP, 2013) envolvendo HDACI (inibidor de histona acetilase) (MONTERO-MELENDEZ et al., 2013; SUGIMOTO et al., 2016).

Diante do exposto acima, experimento de Western blot foi realizado para verificar se assim como em macrófagos, a ANXA1 também poderia modular a expressão proteica de PPARγ. O resultado apresentado na Figura 9 mostra que a expressão basal de PPARγ em neutrófilos de animais ANXA1$^{-/-}$ é menor que o observado em neutrófilos de animais WT, no entanto, na vigência de tratamento com os ligantes de PPAR não houve aumento de expressão do PPARγ em neutrófilos obtidos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$. Este dado é instigante, porque mostra que a ANXA1 endógena modula a expressão de PPARγ em fagócitos (neutrófilos e macrófagos), mas que neutrófilos, quando estimulados por agonistas do receptor PPAR são capazes de expressar normalmente PPARγ, o que não é observado em macrófagos, sugerindo mecanismos distintos da ANXA1 em neutrófilos e macrófagos após estimulação com ligantes de PPAR. Não sabemos quais são os mecanismos responsáveis por estas diferenças, mas as vias de STAT6 e CREB serão também avaliadas em neutrófilos.

Figura 9. Expressão proteica de PPARγ em neutrófilos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$



Neutrófilos peritoneais de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ (solução de glicogênio de ostra 1%, 4 hs) foram tratados com veículo (DMSO+R10), bezafibrato (10 µM), pioglitazona (10 µM) ou LYSO-7 (10 µM), por 2 h. A expressão de PPARγ for obtida por Western Blot e os seus níveis foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de neutrófilos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer. *P<0,05 vs respectivos tratamentos.

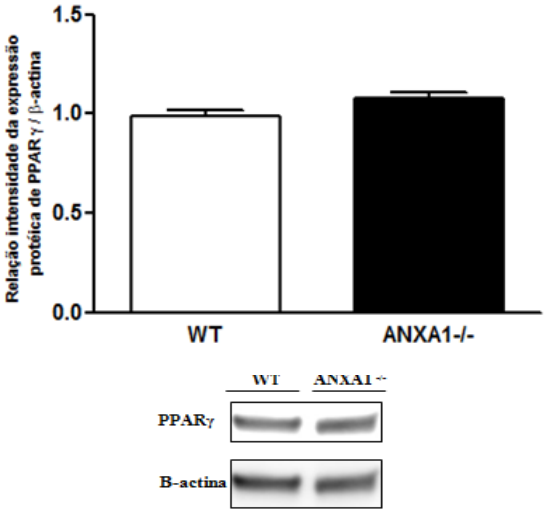
4.9 Efeitos da ANXA1 sobre a expressão proteica de PPARγ em tecido adiposo

PPARγ é extensivamente expresso em tecido adiposo, e estudos já demonstraram que a adiposidade em animais ANXA1$^{-/-}$ e PPARγ$^{-/-}$ encontra-se alterada. AKASHEH et al. (2013), demonstraram que camundongos ANXA1$^{-/-}$ apresentaram maior adiposidade em relação aos WT, diante de dieta rica em lipídios, tendo maior possibilidade de aumento de peso e resistência à insulina. Já camundongos PPARγ$^{-/-}$ apresentaram adiposidade reduzida, devido à falha em seu desenvolvimento e da resistência à insulina (ROSEN et al., 1999; EVANS et al., 2004).

Neste contexto, tecido adiposo foi isolado e a expressão proteica de PPARγ mensurada. Os resultados mostraram que a expressão de PPARγ não foi alterada em tecido adiposo proveniente de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$ (Figura 10), mostrando que no tecido adiposo, a ANXA1 não modula a expressão de PPARγ.

Estes dados corroboram com os mostrados por WARNE et al. (2006), onde a deleção gênica da ANXA1 não afetou a expressão de PPARγ tecido adiposo e de adipócitos, indicando a possibilidade da regulação da expressão de PPAR sejam modulados por outra via, uma vez que os glicocorticoides estão relacionados com a promoção da adipogênese, envolvendo a ativação do PPARγ e de acordo com AKASHEH et al. (2013), a ANXA1 parece ser um importante modular da adiposidade em camundongos.

Figura 10. Expressão proteica de PPARγ em tecido adiposo de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$



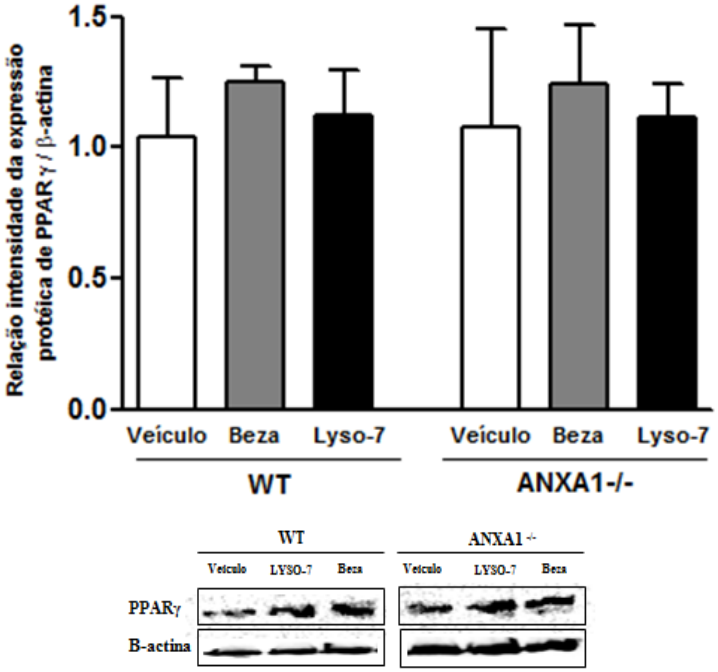
Tecido adiposo epididimal de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ foi coletado e a expressão de PPARγ for obtida por ensaio de Western Blot e os seus níveis foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de tecido adiposo obtido de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer.

4.10 Efeitos da ANXA1 com a expressão proteica de PPARγ em linfócitos

O receptor PPARγ é expresso em linfócitos e estudos em modelos de inflamação intestinal demonstraram que este regula estas células durante o processo inflamatório, podendo modular a expressão gênica de moléculas de adesão e mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-1β e SOCS-3 (supressor de sinalização de citocinas) (GURI et al., 2010).

Com o intuito de ampliar os conhecimentos da ação da ANXA1 sobre a expressão de PPARγ, empregamos linfócitos isolados do baço para averiguar este mecanismo em um leucócito que não possui habilidade de fagocitar. A expressão de PPARγ foi equivalente em linfócitos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$, mesmo após tratamento de ligantes de PPAR, como LYSO-7 (10µM) ou bezafibrato (10µM) por 2 h (Figura 11).

Figura 11. Expressão proteica de PPARγ em linfócitos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$



Linfócitos de baço de camundongos Balb/c WT ou ANXA1$^{-/-}$ foram obtidos, tratados ou não com bezafibrato (10 µM) ou LYSO-7 (10 µM) por 2 h. A expressão de PPARγ for obtida por Western Blot e os seus níveis foram quantificados em relação à expressão de β-actina. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de linfócitos obtidos de 4 animais em cada grupo. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey-Kramer.

4.11 Efeito da ANXA1 sobre apoptose de neutrófilos

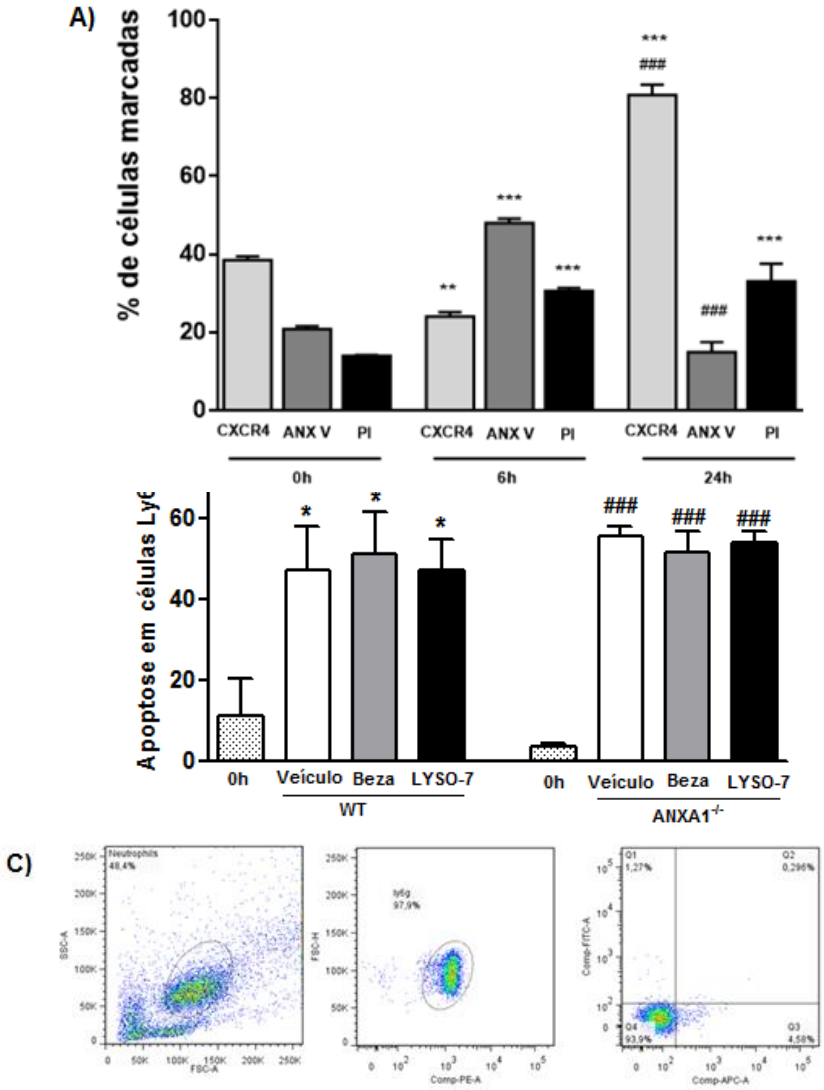
A literatura tem mostrado que a ANXA1 exógena é indutor da apoptose de neutrófilos (SOLITO et al., 2003b). Adicionalmente, foi mostrado recentemente que o peptídeo Ac2-26 da ANXA1 induz a apoptose de neutrófilos, *in vivo*, no modelo de inflamação pleural induzida pelo LPS em camundongos (VAGO et al., 2012). Ainda, os ligantes de PPARs induzem a apoptose de neutrófilos *in vivo* em vários modelos de inflamação (ESPOSITO et al., 2012; PATERNITI et al., 2012; DI PAOLA et al., 2010).

Desta forma, investigamos neste projeto se a ANXA1 endógena poderia mediar a apoptose, se os ligantes de PPAR induzem a apoptose e se existiria uma relação da ANXA1/PPAR no efeito observado.

Inicialmente padronizamos o melhor tempo de incubação de neutrófilos peritoneais e verificamos expressão de ANXV e CXCR4, indicadores de apoptose e senescência, respectivamente, com 6 horas de incubação. Subsequentemente, os resultados mostraram que a deficiência de ANXA1, bem como os tratamentos *in vitro* com bezafibrato ou Lyso-7 não induziram a morte celular. Os resultados obtidos em neutrófilos de animais ANXA1, ou de WT tratados com os ligantes de PPARγ foram equivalentes às células tratadas com os veículos (Figura 12).

Assim, os resultados obtidos aqui mostram que diferentemente do tratamento farmacológico com ANXA1, a ANXA1 endógena não interfere com a apoptose de neutrófilos e que *in vitro*, os agonsitas PPARs também não induzem a apoptose de neutrófilos.

Figura 12. Relação da ANXA1 sobre a taxa de apoptose de neutrófilos tratados ou não com ligantes de PPAR



Neutrófilos foram obtidos utilizando glicogênio de ostra, e tratados ou não com Veículo, LYSO-7 ou Bezafibrato por 2 h, marcados com Anexina V (APC), Ly6G (PE) e CXCR4 (FITC) e avaliados por citometria de fluxo. A) Viabilidade celular de neutrófilos B) Porcentagem de células viáveis após os tratamentos com bezafibrato e LYSO-7 C) Imagens representativas da população de neutrófilos utilizada para análise.

5 CONCLUSÕES.

1) Os ligantes de PPAR, independente da classe e da afinidade pelas isoformas do receptor, induzem a expressão proteica de PPARy em macrófagos de WT neste modelo experimental;

2) A ANXA1 endógena modula a expressão proteica de PPARy em macrófagos peritoneais, tanto em condições basais como na vigência de tratamento com ligantes de PPARs. A ausência de ANXA1 endógena reduziu os níveis de PPARy em macrófagos neste modelo experimental;

3) ANXA1 endógena modula a expressão gênica de PPARy. A ausência de ANXA1 endógena reduziu os níveis de RNAm para PPARy em macrófagos neste modelo experimental;

4) A ANXA1 controla os níveis de CREB em macrófagos. A ausência de ANXA1 endógena aumentou os níveis de CREB em macrófagos neste modelo experimental;

5) A modulação da ANXA1 sobre a expressão protéica de PPARy basal parece não ser dependente da interação da ANXA1 com o receptor FPR2, uma vez que tratamento de macrófagos de WT com antagonista do receptor FPR2 não alterou a expressão basal de PPARy neste modelo experimental. No entanto, o receptor modula a expressão de PPARy após estimulação com Lyso-07, já que macrófagos pre-tratados com antagonista de FPR2 apresentaram redução da expressão de PPARy após tratamento com Lyso-7.

6) A ANXA1 recombinante modula a expressão proteica de PPARy em macrófagos de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$. O tratamento de macrófagos com ANXA1 recombinante recuperou os níveis protéicos de PPARy em macrófagos de animais ANXA1$^{-/-}$ e aumentou os níveis protéicos em macrófagos de animais WT neste modelo experimental;

7) O efeito da ANXA1 sobre a modulação da expressão de PPARy também foi observada em neutrófilos. A ausência de ANXA1 endógena reduziu os níveis de PPARy em neutrófilos neste modelo experimental;

8) A ANXA1 não modula a expressão de PPARy em tecido adiposo ou em linfócitos, já que os níveis deste receptor foi equivalente em tecido adiposo ou em linfócitos coletados de animais WT ou ANXA1$^{-/-}$ neste modelo experimental;

9) A ANXA1 endógena, bem como os ligantes de PPAR, não induzem a apoptose de neutrófilos. A apoptose de neutrófilos de animais ANXA1$^{-/-}$ foi equivalente a de animais WT e os tratamentos com os ligantes de PPAR não afetaram a apoptose neste modelo experimental.

6 REFERÊNCIAS

AHMADIAN, M.; SUH, J.M.; HAH, N.; LIDDLE, C.; ATKINS, A.R.; DOWNES, M.; EVANS, R.M. **PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future.** Nat Med., v.19(5), 557-66, 2013.

AKASHEH, R.T. et al. Increased adiposity in annexin A1-deficient mice.**PloS one**, v. 8, n. 12, p. e82608, 2013.

AKDIS, C.A. & AKDIS, M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 4, p. 735-746, 2009.

ALLDRIDGE, L.C. et al. The annexin protein lipocortin 1 regulates the MAPK/ERK pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 53, p. 37620-37628, 1999.

ALLMAN, D. & PILLAI, S. Peripheral B cell subsets. **Current opinion in immunology**, v. 20, n. 2, p. 149-157, 2008.

ANTONICELLI, F. et al. CREB is involved in mouse annexin A1 regulation by cAMP and glucocorticoids. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 1, p. 62-69, 2001.

ASHLEY, N. T., WEIL, Z. M., NELSON, RANDY, J. **Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation.** An Rev Ecology, Evolution, and Systematics, v. 43 (1), 385-406, 2012.

AYROLDI, E.; CANNARILE, L.; MIGLIORATI, G.; NOCENTINI, G.; DELFINO, D. V.; RICCARDI, C. **Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways.** FASEB jornal, v.26 (12), 4805-20, 2012.

BABAEV, V.R. et al. Conditional Knockout of Macrophage PPARγIncreases Atherosclerosis in C57BL/6 and Low-Density Lipoprotein Receptor–Deficient Mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 8, p. 1647-1653, 2005.

BABBIN, B. A.; LEE, W. Y.; PARKOS, C. A.; WINFREE, L. M.; AKYILDIZ, A.; PERRETTI, M.; NUSRAT, A. **Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors.** J. Biol. Chem., v. 281,19588–19599, 2006.

BAE, Y.S.; LEE, H. Y.; JO, E. J.; KIM, J. I.; KANG, H. K.; YE, R. D.; KWAK, J. Y.; RYU, S.H. **Identification of peptides that antagonize formyl peptide receptor-like**

1-mediated signaling., J. Immunol. *173*: *607*-614, 2004.

BANNENBERG, G. & SERHAN, C.N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: an update. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 12, p. 1260-1273, 2010.

BARISH, G.D.; NARKAR, V.A.; EVANS, R.M. **PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome.** J Clin Invest., v. 116(3), 590-7, 2006.

BEEKUM, O.; FLESKENS, V.; KALKHOVEN, E.. Posttranslational Modifications of PPAR-γ: Fine-tuning the Metabolic Master Regulator.**Obesity**, v. 17, n. 2, p. 213-219, 2009.

BERGER, J.; MOLLER, D.E. **The mechanisms of action of PPARs.** Annu Rev Med., v. 53, 409-35, 2002.

BERRY, A.; BALARD, P.; COSTE, A.; OLAGNIER, D.; LAGANE, C.; AUTHIER, H.; BENOIT-VICAL, F.; LEPERT, J.C.; SÉGUÉLA, J.P.; MAGNAVAL, J.F.; CHAMBON, P.; METZGER, D.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W.; AUWERX, J.; PIPY, B. **IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation.** Eur J Immunol., v. 37 (6), 1642-52, 2007.

BIDDIE, S.; CONWAY-CAMPBELL, B.L.; LIGHTMAN, S.L. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease.**Rheumatology**, p. ker215, 2011.

BIRRELL, M.A.; PATEL, H.J.; MCCLUSKIE, K.; WONG, S.; LEONARD, T.; YACOUB, M.H. **PPAR-γ agonists as therapy for diseases involving airway neutrophilia.** Eur Respir J, v. 24*,* 18*–23,* 2004.

BLUME, K.E. et al. Cell surface externalization of annexin A1 as a failsafe mechanism preventing inflammatory responses during secondary necrosis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8138-8147, 2009.

BLUME, K.E.;, SOEROES, S.; KEPPELER, H.; STEVANOVIC, S.; KRETSCHMER, D.; RAUTENBERG, M.; WESSELBORG, S.; LAUBER, K. **Cleavage of annexin A1 by ADAM10 during secondary necrosis generates a monocytic ‘‘find-me’’ signal.** J Immunol, v. 188, 135-145, 2012.

BORASCHI, D. & ITALIANI, P. Immunosenescence and vaccine failure in the elderly: Strategies for improving response. **Immunology letters**, v. 162, n. 1, p. 346-353, 2014.

BORSKI, R.J. **Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates.**

Trends Endocrinol. Metab., v. 11, 427–436, 2000.

BOUHLEL, M. Amine et al. PPARγ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell metabolism**, v. 6, n. 2, p. 137-143, 2007.

BROSTJAN, C. et al. Glucocorticoid-mediated repression of NFκB activity in endothelial cells does not involve induction of IκBα synthesis.**Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19612-19616, 1996.

BUCKLEY, C.D.; GILROY, D.W.; SERHAN, C.N.; STOCKINGER, B.; TAK, P.O. **The resolution of inflammation.** Nature Rev. Immun, v. 13, 59-66, 2013.

BURNS, K.A. & HEUVEL, J.P. Vanden. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 952-960, 2007.

CALDENHOVEN, E. et al. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. **Molecular endocrinology**, v. 9, n. 4, p. 401-412, 1995.

CARLEZON, W.A.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. The many faces of CREB. **Trends in neurosciences**, v. 28, n. 8, p. 436-445, 2005.

CASTRO-CALDAS, M. et al. **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 of inflammation, v. 12, n. 6, p. 329-337, 2003.

CATTANEO, F.; PARISI, M.; AMMENDOLA, R.. Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 4, p. 7193-7230, 2013.

CHAPMAN, M.J. **Fibrates: therapeutic review.** Br J Diabetes Vasc Dis., v. 6, 11–18, 2006.

CHARO, I. F. Macrophage polarization and insulin resistance: PPARγ in control. **Cell metabolism**, v. 6, n. 2, p. 96-98, 2007.

CHAWLA, A. et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866-1870, 2001.

CHIANG, N.; SERHAN, C.N.; DAHLÉN, S-E.; DRAZEN, J.M.; HAY, D.W.P.; ROVATI, G.E.; SHIMIZU, T.; YOKOMIZO, T.; BRINK, C. **The lipoxin receptor ALX: potent**

ligand-specific and stereoselective actions in vivo. Pharmacol Rev., v. 58, 463–87, 2006.

CHIANG, Ming-Chang et al. **Rosiglitazone promotes neurite outgrowth and mitochondrial function in N2A cells via PPARgamma pathway**.Mitochondrion, v. 14, p. 7-17, 2014.

CHIANG, Ming-Chang et al. **Rosiglitazone activation of PPARγ-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid-beta–induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress**. Neurobiology of aging, v. 40, p. 181-190, 2016.

CHOI, J.H. et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR [ggr] by Cdk5. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 451-456, 2010.

CLARK, A.R. **Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes**. Mol Cell Endocrinol. v. 275 (1-2), 79-97, 2007

COORAY, S. N.; GOBBETTI, T.; MONTERO-MELENDEZ, T.; MCARTHUR, S.; THOMPSON, D.; CLARK, A.J.L.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. **Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 110 (45), 18232–18237, 2013.

CRISTANTE, E.; MCARTHUR, S.; MAURO, C.; MAGGIOLI, E.; ROMERO, I.A.; WYLEZINSKA-ARRIDGE, M.; COURAUD, P.O.; LOPEZ-TREMOLEDA, J.; CHRISTIAN, H.C.; WEKSLER, B.B.; MALASPINA, A.; SOLITO, E**: Identification of an essential endogenous regulator of blood brain barrier integrity: pathological and therapeutic implications**. Proc Natl Acad Sci USA, v. 110, 832–841, 2013.

CROASDELL, A. et al. Resolvins attenuate inflammation and promote resolution in cigarette smoke-exposed human macrophages. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 309, n. 8, p. L888-L901, 2015.

CRUZ-TOPETE, D. &CIDLOWSKI, J.A. One hormone, two actions: anti-and pro-inflammatory effects of glucocorticoids.**Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 1-2, p. 20-32, 2014.

CRUZ-TOPETE, D. & CIDLOWSKI, J.A. One hormone, two actions: anti-and pro-inflammatory effects of glucocorticoids.**Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 1-2, p. 20-32, 2014.

D'ACUNTO, C. Walter et al. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. **Cellular signalling**, v. 26, n. 1, p. 173-178, 2014.

D'ACQUISTO, F. et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1095-1102, 2007.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 152-169, 2008.

DALLI, J.; NORLING, L.V.; RENSHA,W.D.; COOPER, D.; LEUNG, K.Y.; PERRETTI, M. **Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles.** Blood., v. 112 (6), 2512-9, 2008.

DALLI, J.; MONTERO-MELENDEZ, T.; PERRETTI, M.. Annexin A1 N-terminal derived Peptide ac2-26 exerts chemokinetic effects on human neutrophils. **Frontiers in pharmacology**, v. 3, p. 28, 2012.

DAVIDSON, J. et al. Antipyretic actions of human recombinant lipocortin-1.**British journal of pharmacology**, v. 102, n. 1, p. 7-9, 1991.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G.. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-κB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 4, p. 488-522, 2003.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D.. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. **Current opinion in pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 497-504, 2010.

DE VOS, P. et al. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.**Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 4, p. 1004, 1996.

DI PAOLA, R.; CRISAFULLI, C.; MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; PATERNITI, I.; GALUPPO, M.; GENOVESE, T.; THIEMERMANN, C.; CUZZOCREA, S. **GW0742, a high-affinity PPAR -beta/delta agonist, inhibits acute lung injury in mice.** Shock., v. 33 (4), 426-35, 2010.

DONOHUE, M.P.; BARTOLOTTI, L.J.; LI, Y. The N-terminal of annexin A1 as a secondary membrane binding site: A molecular dynamics study. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 82, n. 11, p. 2936-2942, 2014.

DUAN, B. & MOREL, L. Role of B-1a cells in autoimmunity.**Autoimmunity reviews**, v. 5, n. 6, p. 403-408, 2006.

EL KEBIR, D. & FILEP, J.G. Targeting neutrophil apoptosis for enhancing the resolution of inflammation. **Cells**, v. 2, n. 2, p. 330-348, 2013.

ESPOSITO, E.; RINALDI, B.; MAZZON, E.; DONNIACUO, M.; IMPELLIZZERI, D.; PATERNITI, I.; CAPUANO, A.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. **Anti-inflammatory effect of simvastatin in an experimental model of spinal cord trauma: involvement of PPAR-α.** J Neuroinflammation., v. 26, 9:81, 2012.

EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.**Science**, v. 240, n. 4854, p. 889-895, 1988.

EVANS, R.M.; BARISH, Grant D.; WANG, Yong-Xu. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature medicine**, v. 10, n. 4, p. 355-361, 2004.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREE, 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-beta, PGE2, and PAF.** J Clin Invest, v. 101, 890-898, 1998.

FAVEEUW, C. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. **FEBS letters**, v. 486, n. 3, p. 261-266, 2000.

FERREIRA, S. H. et al. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. **British journal of pharmacology**, v. 121, n. 5, p. 883-888, 1997.

FLOWER, R. & ROTHWELL, N.J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends in pharmacological sciences**, v. 15, n. 3, p. 71-76, 1994
.
FREIRE, M.O. & VAN DYKE, T.E. **Natural resolution of inflammation.** Periodontology 2000, v. 63, 149-164, 2013.

FUJIWARA, N.& KOBAYASHI, K. **Macrophages in inflammation.** Curr Drug Targets Inflamm Allergy,v. 4(3), 281-6, 2005.

FUTTER, C.E. & WHITE, I.J. Annexins and endocytosis. **Traffic**, v. 8, n. 8, p. 951-958, 2007.

GALON, J. et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 1, p. 61-71, 2002.

GARREAU DE LOUBRESSE, N.; PROKHOROVA, I.; HOLTKAMP, W.; et al. **Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome.** Nature, v. 513, 517–22, 2014.

GAVINS, F.N.E. et al. Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR-and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4140-4147, 2003.

GAVINS, F. N.; HICKEY, Michael J. Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity. **Front Immunol**, v. 3, p. 354, 2012.

GEARY, L.A. et al. CAF-Secreted Annexin A1 Induces Prostate Cancer Cells to Gain Stem Cell–like Features. **Molecular Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 607-621, 2014.

GERASHCHENKO, M.V. & GLADYSHEV, V.N. **Translation inhibitors cause abnormalities in ribosome profiling experiments.** Nucleic Acids Res, v. 42 (17), e134, 2014.

GERKE, V. & MOSS, S.E. Annexins: from structure to function.**Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 331-371, 2002.

GERKE, V.; CREUTZ, C.E.; MOSS, S.E. Annexins: linking Ca2+ signalling to membrane dynamics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 6, p. 449-461, 2005.

GETTING, S.J.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. **British journal of pharmacology**, v. 120, n. 6, p. 1075-1082, 1997.

GILROY, D.W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G. **Inflammatory resolution: new opportunities for drug Discovery**. Nature reviews.v. 3, 401-16, 2004.

GIROL, A.P. et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 11, p. 5689-5701, 2013.

GOENKA, S AND . KAPLAN, M.H. **Transcriptional regulation by STAT6**. Immunol Res,v. 50(1), 87–96, 2011.

GOLDENBERG, I.; BENDERLY, M.; GOLDBOURT, U.. Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. **Vascular health and risk management**, v. 4, n. 1, p. 131, 2008.

GURI, A.J.; MOHAPATRA, S.K.; HORNE, W.T.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J. **The role of T cell PPAR gamma in mice with experimental inflammatory bowel disease.** BMC Gastroenterol., v 10;10:60, 2010.

HAMBLIN, M. et al. Vascular Smooth Muscle Cell Peroxisome Proliferator–Activated Receptor-γ Mediates Pioglitazone-Reduced Vascular Lesion Formation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 2, p. 352-359, 2011.

HARDY, R.R. B-1 B cell development. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 2749-2754, 2006.

HARRIS, S. G. & PHIPPS, R. P**. The nuclear receptor PPARγ is expressed by mouse T lymphocytes and PPARγ agonists induce apoptosis.** Eur. J. Immunol. v. 31, 1098–1105, 2001.

HAUBENWALLNER, S.; ESSENBURG, A.D.; BARNETT, B.C.; PAPE, M.E.; DEMATTOS, R.B.; KRAUSE, B.R.; MINTON, L.L.; AUERBACH, B.J.; R S NEWTON, R.S.; LEFF, T. **Hypolipidemic activity of select fibrates correlates to changes in hepatic apolipoprotein c-iii expression: a potential physiologic basis for their mode of action.** J lipid res., v. 12, 2541–51, 1995.

HAYHOE, R. P.; KAMAL, A. M.; SOLITO, E.; FLOWER, R. J.; COOPER, D.; PERRETTI, M. **Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil–endothelium interactions under flow: Indication of distinct receptor involvement.** Blood. v. 107, 2123–2130, 2006.

HERZIG, S et al. **CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-γ**. Nature, v. 426, n. 6963, p. 190-193, 2003.

HOU, J.; SCHINDLER, U.; HENZEL, W.J.; HO, T.C.; BRASSEUR, M.; MCKNIGHT, S.L. **An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat.** Science, v 265(5179),1701-6, 1994.

HSU, L. et al. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. **Nature**, v. 428, n. 6980, p. 341-345, 2004.

HUANG, W. & GLASS, C.K. Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance.**Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 8, p. 1542-1549, 2010.

IMAI, T. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse.**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4543-4547, 2004.

ISHIDO, M. Overexpression of Bcl-2 inhibits nuclear localization of annexin I during tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in porcine renal LLC-PK 1

cells. **Regulatory peptides**, v. 124, n. 1, p. 45-51, 2005.

JOHNSON, G.L.; & LAPADAT, R. **Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.** Science, v. 298 (5600), 1911-2, 2002.

KADMIEL, M. & CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 9, p. 518-530, 2013.

KALLEN, C.B.; LAZAR, M. A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 12, p. 5793-5796, 1996.

KEMNITZ, J.W.; ELSON, D.F.; ROECKER, E.B.; BAUM, S.T.; BERGMAN, R.N.; MEGLASSON, M.D. **Pioglitazone increases insulin sensitivity, reduces blood glucose, insulin, and lipid levels, and lowers blood pressure, in obese, insulin-resistant rhesus monkeys.** Diabetes. v.43(2):204-11, 1994.

KHAU, T. et al. Annexin-1 signals mitogen-stimulated breast tumor cell proliferation by activation of the formyl peptide receptors (FPRs) 1 and 2.**The FASEB Journal**, v. 25, n. 2, p. 483-496, 2011.

KILROY, G.E.; ZHANG, X.; FLOYD, Z.E.. PPAR-γ AF-2 Domain Functions as a Component of a Ubiquitin-dependent Degradation Signal. **Obesity**, v. 17, n. 4, p. 665-673, 2009.

KIM, K.M. et al. Annexin-I inhibits phospholipase A2 by specific interaction, not by substrate depletion. **FEBS letters**, v. 343, n. 3, p. 251-255, 1994.

KIM, J. H. et al. Suppression of PPARγ through MKRN1-mediated ubiquitination and degradation prevents adipocyte differentiation. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 4, 2014.

KLIEWER, S.A. et al. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, v. 358, n. 6389, p. 771-774, 1992.

KOYASU, S. & MORO, K. Role of innate lymphocytes in infection and inflammation. **Front Immunol**, v. 3, n. 5, p. 101, 2012.

LANNAN, E. A. et al. Proinflammatory actions of glucocorticoids: glucocorticoids and TNFα coregulate gene expression in vitro and in vivo.**Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3701-3712, 2012.

LARSEN, T.M.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A**. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy?** Int J Obes Relat Metab Disord, v. 27, 147–161, 2003.

LEE, D. M.; FRIEND, D. S.; GURISH, M. F.; BENOIST, C.; MATHIS, D.; BRENNER, M. B. **Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis.** Science, v. 297 (5587), 1689-92, 2002.

LEONI, G. et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 1, p. 443-454, 2013.

LEVY, B.D. et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nature immunology**, v. 2, n. 7, p. 612-619, 2001.

LIM, L.H.; SOLITO, E.; RUSSO-MARIE, F.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. **Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 95, 14535-14539, 1998.

LIM, L. H. K. & PERVAIZ, S. **Annexin 1: the new face of an old molecule.** FASEB, v. 21 (4), 968-75, 2007.

LOCATELLI, I.; SUTTI, S.; JINDAL, A.; VACCHIANO, M.; BOZZOLA, C.; REUTELINGSPERGER, C.; KUSTERS, D.; BENA, S.; PAROLA, M.; PATERNOSTRO, C.; BUGIANESI, E.; MCARTHUR, S.; ALBANO, E.; PERRETTI, M. **Endogenous Annexin A1 Is a Novel Protective Determinant in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice.** Hepatology, v. 60 (2), 531-544, 2014.

MACHADO, I.D. et al. Alterations in the profile of blood neutrophil membrane receptors caused by in vivo adrenocorticotrophic hormone actions. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 9, p. E754-E763, 2014.

MACHADO, I.D. et al. Aqueous Extract of Rosmarinus officinalis L. Inhibits Neutrophil Influx and Cytokine Secretion. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 1, p. 125-133, 2015.

MADERNA, P. et al. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac2–26. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3727-3733, 2005.

MAGLICH, J.M. et al. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, Caenorhabditis elegans and Drosophila genomes. **Genome Biol**, v. 2, n. 8, p. 1-

0029, 2001.

MAJAI, G. et al. PPARγ-dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells. **European journal of immunology**, v. 37, n. 5, p. 1343-1354, 2007.

MÄKELÄ, J et al. **Peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ) agonist is neuroprotective and stimulates PGC-1α expression and CREB phosphorylation in human dopaminergic neurons**.Neuropharmacology, v. 102, p. 266-275, 2016.

MANGELSDORF, D.J. et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. **Genes & development**, v. 6, n. 3, p. 329-344, 1992.

MANTOVANI, Alberto et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in immunology**, v. 25, n. 12, p. 677-686, 2004.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MARX, N.; SUKHOVA, G.; MURPHY, C.; LIBBY, P.; PLUTZKY, J. **Macrophages in human atheroma contain PPARγ: differentia- tion-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor γ (PPARγ) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARγ activation in mononuclear phagocytes in vitro.** Am. J. Pathol., v. 153,17-23, 1998.

MCMASTER, A. & RAY, D.W. Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. **Experimental physiology**, v. 92, n. 2, p. 299-309, 2007.

MCMASTER, A. & RAY, D.W. Drug insight: selective agonists and antagonists of the glucocorticoid receptor. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 91-101, 2008.

MICHLEWSKA, S. et al. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-α. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 3, p. 844-854, 2009.

MCHEYZER-WILLIAMS, M.G. B cells as effectors. **Current opinion in immunology**, v. 15, n. 3, p. 354-361, 2003.

MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation.** Nature, v. 454,

428-435, 2008.

MESQUITA JR, D. et al. Autoimmune diseases in the TH17 era. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 6, p. 476-486, 2009.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Immune system-part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MICHALIK, L. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 4, p. 726-741, 2006.

MIKITA, T. et al. Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 10, p. 5811-5820, 1996.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E. & DORSHKIND, K. B-1 B cell development in the fetus and adult. **Immunity**, v. 36, n. 1, p. 13-21, 2012.

MONTERO-MELENDEZ, T.; DALLI, J.; PERRETTI, M.. Gene expression signature-based approach identifies a pro-resolving mechanism of action for histone deacetylase inhibitors. **Cell Death & Differentiation**, v. 20, n. 4, p. 567-575, 2013.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

NATHAN, C. **Points of control in inflammation.** Nature, v. 420: 19-26, 2002.

NORLING, L.V.; PERRETTI, M.; COOPER, D.. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. **Journal of Endocrinology**, v. 201, n. 2, p. 169-184, 2009.

NORLING, L.V. & PERRETTI, M. Control of myeloid cell trafficking in resolution. **Journal of innate immunity**, v. 5, n. 4, p. 367-376, 2013.

NOVAK, M.L. & KOH, T.J. Macrophage phenotypes during tissue repair. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. 6, p. 875-881, 2013.

OBERHAMMER, F. et al. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. **The EMBO journal**, v. 12, n. 9, p. 3679, 1993.

OBRIG, T.G. et al. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes.**Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 1, p. 174-181, 1971.

ODEGAARD, J. I. et al. Macrophage-specific PPAR&ggr; controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116-1120, 2007.

OKSVOLD, M.P.; PEDERSEN, N.M.; FORFANG, L.; SMELAND, E.B**. Effect of cycloheximide on epidermal growth factor receptor trafficking and signaling.** FEBS Lett., v. 586 (20), 3575-81, 2012.

OLIANI, S.M. et al. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. **Laboratory investigation**, v. 80, n. 9, p. 1429-1438, 2000.

ORASANU, G.; ZIOUZENKOVA, O.; DEVCHAND, P.R.; NEHRA, V.; HAMDY, O.; HORTON, E.S.H.; PLUTZKY, J. **The PPARγ Agonist Pioglitazone Represses Inflammation In A PPARα-Dependent Manner In Vitro and In Vivo In Mice.** J Am Coll Cardiol. v.52(10): 869–881, 2008.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. **Resolution of inflammation: an integrated view.** EMBO Mol Med, v. 5, 661–674, 2013.

PARK, J.M. et al. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis—CREB and NF-κB as key regulators.**Immunity**, v. 23, n. 3, p. 319-329, 2005.

PARKIN, J. & COHEN, B. An overview of the immune system.**The Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-1789, 2001.

PARULKAR, A.A. et al. Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones.**Annals of Internal Medicine**, v. 134, n. 1, p. 61-71, 2001.

PASCUAL, G. et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-γ. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 759-763, 2005.

PATEL, D.M. et al. Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. **Journal of cell science**, v. 124, n. 4, p. 578-588, 2011.

PATEL, H.B.; KORNERUP, K.N.; SAMPAIO, A.L.; D'ACQUISTO, F.; SEED, M.P.; GIROL, A.P.; GRAY, M.; PITZALIS, C.; OLIANI, S.M.; PERRETTI, M. **The impact of endogenous annexin A1 on glucocorticoid control of inflammatory arthritis.**

Ann Rheum Dis, v. 71, 1872–1880, 2012.

PATERNITI, I.; MAZZON, E.; RICCARDI, L.; GALUPPO, M.; IMPELLIZZERI, D.; ESPOSITO, E.; BRAMANTI, P.; CAPPELLANI, A.; CUZZOCREA, S. **Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 ameliorates cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in mice.** Surgery, v. 152 (1), 90-106. 2012.

PERRETTI, M. et al. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. **Nature medicine**, v. 2, n. 11, p. 1259-1262, 1996.

PERRETTI, M. et al. Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. **Cell biology international**, v. 24, n. 3, p. 163-174, 2000.

PERRETTI, M. The annexin 1 receptor (s): is the plot unravelling?.**Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 11, p. 574-579, 2003.

PERRETTI, M.; SOLITO, E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis.**Biochemical Society Transactions**, v. 32, n. 3, p. 507-510, 2004.

PERRETTI, M. & FLOWER, R.J.. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 1, p. 25-29, 2004.

PERRETTI, M. & D'ACQUISTO, F. **Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation**. Nature reviews, Immunology, v. 9 (1), 62-70, 2009.

PERRETTI, M. & DALLI, J. Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 936-946, 2009.

PERRETTI, M.. Editorial: To resolve or not to resolve: Annexin A1 pushes resolution on track. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 2, p. 245-247, 2012.

PESCE, J. et al. Arginase-1–expressing macrophages suppress Th2 cytokine–driven inflammation and fibrosis. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 4, p. e1000371, 2009.

PIN, A. et al. Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30541-30551, 2012.

PUPJALIS, D.; GOETSCH, J.; KOTTAS, D.J.; GERKE, V.; RESCHER, U**. Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling.** EMBO Mol MedFeb., v. 3 (2), 102-14, 2011.

QIANG, L. et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparγ. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 620-632, 2012.

RAY, A. & PREFONTAINE, K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 2, p. 752-756, 1994.

RAYNAL, P. & POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1197, n. 1, p. 63-93, 1994.

RESCHER, U. et al. Functional activation of the formyl peptide receptor by a new endogenous ligand in human lung A549 cells. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 3, p. 1500-1504, 2002.

RESCHER, U. et al. Proteolytic cleavage of annexin 1 by human leukocyte elastase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 11, p. 1320-1324, 2006.

RICOTE, M.; HUANG, J.T.; WELCH, J.S.; GLASS, C.K**. The peroxisome proliferators-activated receptor (PPARγ) as a regulator of monocyte/macrophage function.** J Leukoc Biol., 66, 733-9, 1999.

RIEUSSET, J. et al. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor γ antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 11, p. 2628-2644, 2002.

RIGAMONTI, E.; CHINETTI-GBAGUIDI, G.; STAELS, B. Regulation of macrophage functions by PPAR-α, PPAR-γ, and LXRs in mice and men. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 28, n. 6, p. 1050-1059, 2008.

ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 85, n. 1, p. 9-21, 2000.

ROSEN, E.D. et al. PPARγ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Molecular cell**, v. 4, n. 4, p. 611-617, 1999.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. **PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth.** J Biol Chem. v. 276(41), 37731-4, 2001.

ROSEN, J. & MINER, J.N. The search for safer glucocorticoid receptor ligands. **Endocrine reviews**, v. 26, n. 3, p. 452-464, 2005.

ROSENGARTH, A. & LUECKE, H. A **Calcium-driven Conformational Switch of the N-terminal and Core Domains of Annexin A1.** Journal of Molecular Biology, v. 326 (5), 1317-1325, 2003.

ROSENTHAL, S.A. & FURNARI, I. **The use of cyctoheximide-chloramphenicol medium in routine culture for fungi.** J. Invest. Derm. v. 28, 367—371, 1957.

RŐSZER, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

SAFFAR, A.S.; ASHDOWN, H.; GOUNNI, A.S. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival.**Current drug targets**, v. 12, n. 4, p. 556, 2011.

SAMUELSSON, B. et al. **Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects**. Science, v. 237, n. 4819, p. 1171-1176, 1987.

SANTIN, J.R.; UCHÔA, F.D.; LIMA, M. do C., RABELLO, M.M.; MACHADO, .I.; HERNANDES, M.Z.; AMATO, A.A.; MILTON, F.A.; WEBB, P.; NEVES, F.D.E.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; FARSKY, S.H**. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor.** Eur J Pharm Sci., v. 48 (4-5), 689-97, 2013a.

SANTIN, J.R.; MACHADO, I.D.; RODRIGUES, S.F.P.; TEIXEIRA, S.; MUCARÁ, M.N.; GALDINA, S.L.; PITTA, I.R.; FARSKY, S.H.P**. Role of an Indole-Thiazolidine Molecule PPAR Pan-Agonist and COX Inhibitor on Inflammation and Microcirculatory Damage in Acute Gastric Lesions.** PLoS One. 2013; 8(10): e76894, 2013b.

SATOH, T. et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. **Nature immunology**, v. 11, n. 10, p. 936-944, 2010.

SAVAGE, D.B. et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-γ. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 910-917, 2003.

SAVILL, J.,DRANSFIELD, I., GREGORY, C., HASLETT, C. **A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.** Nature Rev Imun, v. 2, 965-975, 2002.

SCANNELL, M.; FLANAGAN, M.B.; DESTEFANI, A.; WYNNE, K.J.; CAGNEY, G.; GODSON, C.; MADERNA, P**. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages.** J. Immunol., v. 178, 4595–4605,2007.

SCHEINMAN, R.I. et al. Role of transcriptional activation of IκBα in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 283-286, 1995.

SCHNEIDER-POETSCH, T.; JU, J.; EYLER, D.E.; DANG, Y.; BHAT, S.; et al. **Inhibitation of eukaryotic translation elongation by cycoheximide and lactimidomycin.** Nat Chem Bio, v. 6, 209–217, 2010.

SCHOONJANS, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, H**. Induction of the acyl- coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferators response element in the C promoter.** J Biol Chem, v. 270, 19269-76, 1995.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. **Role of the peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expression.** J Lipid Res, v.37, 907-25, 1996.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. **The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation.** Biochim Biophys Acta., v. 1302 (2), 93-109, 1996a.

SCODITTI, E et al. **PPARγ agonists inhibit angiogenesis by suppressing PKCα- and CREB-mediated COX-2 expression in the human endothelium**.Cardiovascular research, v. 86, n. 2, p. 302-310, 2010.

SERHAN, C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 101-137, 2007.

SERHAN, C.N., BRAIN, S.D., BUCKLEY, C.D., GILROY, D.W., HASLETT, C., O'NEILL, L.A., PERRETTI, M., ROSSI, A.G., WALLACE, J.L. **Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms.** FASEB J, v. 21 (2), 325-332,

2007.

SERHAN, C.N., CHIANG, N., VAN DYKE, T.E. **Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators.** Nat Rev Immunol, v. 8, 349-361, 2008.

SFEIR, Z. et al. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 57, n. 1, p. 17-21, 1997.

SICA, A. & MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.

SILISTINO-SOUZA, R. et al. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **International journal of cancer**, v. 120, n. 12, p. 2582-2589, 2007.

SINGH, S et al. **Relaxin Activates Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPARγ) through a Pathway Involving PPARγ Coactivator 1α (PGC1α).** Journal of Biological Chemistry, v. 290, n. 2, p. 950-959, 2015.

SHIBASAKI, M. et al. A PPAR agonist improves TNF-α-induced insulin resistance of adipose tissue in mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 309, n. 2, p. 419-424, 2003.

SOLITO, E. et al. U937 cells deprived of endogenous annexin 1 demonstrate an increased PLA2 activity. **British journal of pharmacology**, v. 124, n. 8, p. 1675-1683, 1998.

SOLITO, E.; MULLA, A.; MORRIS, J. F.; CHRISTIAN, H. C.; FLOWER, R. J.; BUCKINGHAM, J. C. **Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen- activated protein kinase.** Endocrinology, v. 144, 1164, 2003a.

SOLITO, E.; KAMAL, A.; RUSSO-MARIE, F.; BUCKINGHAM, J.C.; MARULLO, S.; PERRETTI, M. **A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils.** FASEB J., v. 17 (11), 1544-6, 2003b.

SOLITO, E. et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **The FASEB journal**, v. 20, n. 9, p. 1498-1500, 2006.

SONG, I.H.; GOLD, R.; STRAUB, R.H. **New Glucocorticoids on the horizon: repress, don't active!** J Rheumatol, v. 32 (6), 1199-207, 2005.

SONG, I.H. & BUTTGEREIT, F.. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 246, n. 1, p. 142-146, 2006.

SOOD, V.; COLLERAN, K.; BURGE, M.R. Thiazolidinediones: a comparative review of approved uses. **Diabetes technology & therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 429-440, 2000.

STAHN, C.; LÖWENBERG, M.; HOMMES, D.W.; BUTTGEREIT, F. **Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists.** Mol Cell Endocrinol. v. 275 (1-2), 71-8, 2007.

STEINHOFF, M; VERGNOLLE, N.; YOUNG, S.H.; TOGNETTO, M.; AMADESI, S.; ENNES, H.S.; TREVISANI, M.; HOLLENBERG, M.D.; WALLACE, J.L.; CAUGHEY, G.H.; MITCHELL, S.E.; WILLIAMS, L.M.; GEPPETTI, P.; MAYER, E.A.; BUNNETT, N.W. **Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism.** Nature Med. v. 6, 151-158, 2000.

SUGIMOTO, M.A. et al. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

SUNDAHL, N. et al. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. **Pharmacology & therapeutics**, v. 152, p. 28-41, 2015.

SWAIRJO, M.A. et al. Ca2+-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 2, n. 11, p. 968-974, 1995.

SWANSON, C.R. et al. The PPAR-γ agonist pioglitazone modulates inflammation and induces neuroprotection in parkinsonian monkeys. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 91, 2011.

SZANTO, A.; BALINT, B.L.; NAGY, Z.S.; BARTA, E.; DEZSO, B.; PAP, A.; SZELES, L.; POLISKA, S.; OROS, M.; EVANS, R.M.; BARAK, Y.; SCHWABE, J.; NAGY, L. **STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARγ-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells.** Immunity. v. 33 (5), 699-712, 2010.

SZATMARI, I.; RAJNAVOLGYI, E.; NAGY, L.. PPARγ, a Lipid-Activated Transcription Factor as a Regulator of Dendritic Cell Function.**Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1088, n. 1, p. 207-218, 2006.

SZATMARI, I. et al. PPARγ regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3271-3280, 2007.

TAGOE, C.E. et al. Annexin-1 mediates TNF-α-stimulated matrix metalloproteinase secretion from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.**The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2813-2820, 2008.

TAKEDA, K. et al. Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 8, p. 3220-3222, 1996.

TANGYE, S.G. et al. The good, the bad and the ugly [mdash] TFH cells in human health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 412-426, 2013.

TAVARES, V.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C.. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Ppargama): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 51, n. 4, p. 526-533, 2007.

TAYLOR, E. L.; ROSSI, A. G.; DRANSFIELD, I.; HART, S. P. **Analysis of neutrophil apoptosis.** Methods Mol. Biol., v. 412, 177–200, 2007.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.M. **Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor.** Cell, v. 79(7),1147-56, 1994.

TONTONOZ, P.; NAGY, L.; ALVAREZ, J. G. A.; THOMAZY, V. A.; EVANS, R. M. **PPARγ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.** Cell, v. 93, 241-252, 1998.

URB, M. & SHEPPARD, D.C. The role of mast cells in the defence against pathogens. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.

VAGO, J.P.; NOUGEIRA, 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, 249–258, 2012.

VAN DYKE, T.E.; SERHAN, C.N. **A novel approach to resolving inflammation**. Sci Am Oral and Whole Body Health, p. 42-45, 2006.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; LIBERT, C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. **Traffic**, v. 13, n. 3, p. 364-374, 2012.

VANDEVYVER, S. et al. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 993-1007, 2013.

VONG, L. et al. Annexin 1 Cleavage in Activated Neutrophils a Pivotal Role for Proteinase 3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 41, p. 29998-30004, 2007.

WAHLI, W.; BRAISSANT, O.; DESVERGNE, B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more…. **Chemistry & biology**, v. 2, n. 5, p. 261-266, 1995.

WAHLI, W. & MICHALIK, L.. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 7, p. 351-363, 2012.

WALTHER, A.; RIEHEMANN, K.; GERKE, V.. A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. **Molecular cell**, v. 5, n. 5, p. 831-840, 2000.

WELCH, J.S.; RICOTE, M.; AKIYAMA, T.E.; GONZALEZ, F.J.; GLASS, C.K. **PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100 (11), 6712-7, 2003.

WIDLAK, P.; PALYVODA, O.; KUMALA, S.; GARRARD, W. T. **Modeling apoptotic chromatin condensation in normal cell nuclei. Requirement for intranuclear mobility and actin involvement.** J. Biol. Chem., *v.* 277, 21683-21690, 2002.

WILLSON, T.M. et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 4, p. 527-550, 2000.

WISSINK, S. et al. Distinct domains of the RelA NF-κB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 35, p. 22278-22284, 1997.

WISSINK, S. et al. A dual mechanism mediates repression of NF-κB activity by glucocorticoids. **Molecular endocrinology**, v. 12, n. 3, p. 355-363, 1998.

YANG, Y. et al. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n. 7, p. 1538-1544, 1999.

YANG, X.Y. et al. Activation of Human T Lymphocytes Is Inhibited by Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPARγ) Agonists PPARγ CO-ASSOCIATION

WITH TRANSCRIPTION FACTOR NFAT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 4541-4544, 2000.

YKI-JÄRVINEN, H. Thiazolidinediones. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 11, p. 1106-1118, 2004.

ZEN, M. et al. The kaleidoscope of glucorticoid effects on immune system. **Autoimmunity reviews**, v. 10, n. 6, p. 305-310, 2011.

ZOUALI, M. & RICHARD, Y. Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity. **Front Immunol**, v. 2, p. 63, 2011.

ZOUKI, C.; OUELLET, S.; FILEP, J.G. The anti-inflammatory peptides, antiflammins, regulate the expression of adhesion molecules on human leukocytes and prevent neutrophil adhesion to endothelial cells. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 3, p. 572-580, 2000.

ANEXOS

Anexo 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 argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir 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 argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição 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 argüição.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

Anexo 2 – 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 - 8853740/1 - Carina Harumi Takahama

Email:	ctakahama@usp.br
Data de Nascimento:	26/04/1988
Cédula de Identidade:	RG - 43.582.192-1 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Famacêutica - Fundação Universidade Estadual de Londrina - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	04/12/2013
Início da Contagem de Prazo:	04/12/2013
Data Limite para o Depósito:	06/06/2016
Orientador Acadêmico:	Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 04/12/2013 até 21/01/2014. Email: ernani@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 22/01/2014 até o presente. Email: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/12/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 17/12/2014
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 04/12/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2016
Impresso em: 01/05/2016 21:10:35

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9141 - 8853740/1 - Carina Harumi Takahama

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	94	A	N	Concluída
FBC5803-3/3	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	11/03/2014	24/03/2014	30	2	75	A	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5802-3/4	Tópicos Avançados em Toxicologia I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5772-2/1	Conexões das Vias de Ativação dos Processos Inflamatórios Periféricos e Centrais	22/09/2014	12/10/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5761-6/2	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	02/02/2015	04/03/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5784-3/6	Tópicos Avançados em Toxicologia II	03/03/2015	16/06/2015	15	1	100	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	C	N	Concluída
FBC5752-3/1	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	11/06/2015	16/07/2015	45	3	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	25
Estágios:			
Total:	10	25	25

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 08/02/2016
Impresso em: 01/05/2016 21:10:35

Anexoo 3 – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF **60.2014-P461**

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Controle da Anexina A1 sobre a expressão de receptores nucleares em diferentes tipos celulares**" (Protocolo CEUA/FCF/461), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Carina Harumi Takahama**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **04 de julho de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 7 de julho de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

UNVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0052014/FCF

São Paulo, 20 de março de 2014

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "***Controle da anexina A1 sobre a expressão de receptores nucleares em diferentes tipos celulares***".

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

Prof. Dr. MARIO HIROUIKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.
Profa. Dra. **SANDRA HELENA POLISELLI FARSKY**
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP
NESTA

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone/fax: (011) 3091-3678 - e-mail: atadfcf.usp.br