

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Participação da galectina-1 na homeostase de neutrófilos**

**Luisa Mestriner**

**Ribeirão Preto  
2022**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Participação da galectina-1 na homeostase de neutrófilos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências,

Área de Concentração: Imunologia e fisiopatologia.

**Orientada:** Luisa Mestriner

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia no dia 16/08/2022. A versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto  
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mestriner, Luisa

Participação da galectina-1 na homeostase de neutrófilos.  
Ribeirão Preto, 2022.

65p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Dias Baruffi, Marcelo.

1. Galectina. 2. Reconhecimento Fagocítico. 3. Neutrófilos.  
4. Macrófagos

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Luisa Mestriner

Título do trabalho: Participação da galectina-1 na homeostase de neutrófilos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedicatória*

Dedico esse trabalho à minha família:  
Meus pais Darlene e Marcelo  
Meu irmão Lucas  
Meus avós Diva, Moacyr, Marisa e Darcy  
Meus tios Dalton, Elaine, Norberto e Thaís  
Meus primos André e Daniel  
e todos os integrantes da nossa enorme e carinhosa família

Pelo amor e apoio incondicional fornecidos durante essa e todas as etapas de minha vida, sem vocês nada disso seria possível. À vocês meu muito obrigada!

*Agradecimientos*

**Ao professor Dr. Marcelo Dias Baruffi,**

Pela oportunidade de desenvolver e confiar a mim o desenvolvimento deste trabalho. Pela orientação acadêmica, mas também pela orientação de desenvolvimento pessoal. Por ser o maior exemplo de empenho em sala de aula e de amor à ciência que me inspira seguir a carreira acadêmica. Obrigada por tudo.

**Ao grupo de Imagem Molecular em Oncologia do IPEN,**

Prof, Dr. Emerson Soares Bernardes, Andy González, Arian Perez, Dino Gushiken, Fábio Fernando da Silva, Guilherme Bonifácio, Jhonatas Pereira, Maria Ângela Carneiro, Raíssa Nascimento, Raphael Andrade e Yasniel Araujo pela receptividade e companhias tão agradáveis durante minha estadia em São Paulo. Agradeço especialmente à Dra. Sofia Nascimento dos Santos pelos ensinamentos e disponibilidade em me auxiliar durante experimentos. Muito obrigada a todos, é ótimo trabalhar com vocês!

**Ao Laboratório de Imunologia e Inflamação Pulmonar da FMRP-USP,**

Professora Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato, Thaís Fraga da Silva e Ualter Cipriano pelos ensinamentos e auxílio na realização dos experimentos. É ótimo trabalhar com vocês!

**Ao Laboratório de Hematologia Experimental da FARM-USP,**

Professor Dr. Ricardo Ambrosio Fock, Edson Makiyama e Carlos Gonçalves pelo aprendizado e apoio durante a realização dos experimentos. É muito bom trabalhar com vocês!

**Ao Laboratório de Sinalização Celular na Resposta Inflamatória da FMRP-USP,**

Professora Dra. Larissa Dias da Cunha e Marlon Rocha pela disponibilidade e ajuda durante os experimentos. É ótimo trabalhar com vocês!

**Ao Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP,**

Professora Dra. Maria Cristina Nonato, Iara Cardoso, Luana Zapata, Olivia Teixeira e Thamires Froes pelo auxílio na realização dos experimentos. Obrigada pela amizade e convívio!



**Aos amigos do laboratório de Glicoimunologia da FCFRP-USP,**

Anna Karoline Aguiar, Carlos Fuzo, Fábio Kubata, Gisele Portapilla, Lílian Cataldi, Martin Amstalden, Rubens Eduardo, Thaís Canassa e Victor Bastos que fizeram da rotina de trabalho momentos tão agradáveis e de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. É um prazer trabalhar com vocês!

**Ao serviço de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,**

e aos funcionários do Programa de Biociências e Biotecnologia, por todos os serviços prestados e disponibilidade.

**À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,**

Por me acolher desde 2014 no início da minha graduação, pelos excelentes profissionais e pelo suporte por todos esses anos.

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),**

Pelo apoio financeiro - Código de Financiamento 001.

**Aos meus caros amigos,**

Ótávio, Vitor, Martin, Renan, pelo apoio emocional e incentivo no dia a dia de todos esses anos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*Epígrafe*

Tente novamente.

Falhe novamente.

Falhe melhor.

Samuel Beckett



## RESUMO

MESTRINER, L. **Participação da galectina-1 na homeostase de neutrófilos.** 2022. 65f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A remoção fagocítica de neutrófilos nos tecidos inflamados é um evento crítico da homeostase leucocitária e sua falha está relacionada a várias doenças associadas ao descontrole da resposta inflamatória. A galectina-1 (Gal-1) é uma proteína multifuncional ligadora de glicanas, com propriedades anti-inflamatórias, capaz de induzir a exposição de fosfatidilserina (FS) na superfície dos neutrófilos, favorecendo seu reconhecimento fagocítico por macrófagos *in vitro*. Essa proteína também está associada na mudança de fenótipo de macrófagos durante a resolução da inflamação. No entanto, o processo de homeostase de neutrófilos ainda não está totalmente esclarecido e mais estudos são necessários para a melhor compreensão do papel da Gal-1 neste processo. Neste trabalho foi avaliado o impacto da Gal-1 de camundongo (endógena e exógena) na mediação da fagocitose de neutrófilos por macrófagos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, foi investigada a potencial correlação do gene da Gal-1 (*Lgals1*) com genes das vias biológicas do processo de fagocitose por macrófagos. O hemograma e mielograma de camundongos C57BL/6 selvagens (*Lgals1<sup>+/+</sup>*) e deficientes do gene Gal-1 (*Lgals1<sup>-/-</sup>*) foram realizados na ausência de inflamação, e foi detectado um aumento de neutrófilos no sangue e uma redução no número de neutrófilos maduros na medula óssea de camundongos *Lgals1<sup>-/-</sup>*. Tioglicolato (3%) foi injetado no peritônio de camundongos *Lgals1<sup>+/+</sup>* e *Lgals1<sup>-/-</sup>* e o lavado do sítio inflamatório foi realizado com 4, 18 e 90 horas após o estímulo, com o intuito de analisar a cinética do acúmulo de neutrófilos no peritônio. Camundongos *Lgals1<sup>-/-</sup>* apresentam um maior número de neutrófilos nos períodos de 4 e 18 horas, indicando uma maior migração dessas células para o sítio inflamatório e uma possível queda na taxa de remoção destes leucócitos por macrófagos residentes. Células do timo *Lgals1<sup>+/+</sup>* foram tratadas com Gal-1 de camundongo recombinante (Gal-1c) e incubadas com macrófagos *Lgals1<sup>+/+</sup>* ou *Lgals1<sup>-/-</sup>* e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados indicaram uma maior eficiência fagocítica macrófagos *Lgals1<sup>+/+</sup>*. A análise de dados públicos de transcriptoma indicou que o gene *Lgals1* é diferencialmente expresso em macrófagos co-cultivados com linfócitos apoptóticos em comparação a macrófagos controle. Além disso, o aumento da expressão de *Lgals1* nestes macrófagos mostrou uma robusta correlação com genes diferencialmente expressos e envolvidos em diferentes vias do processo de fagocitose por macrófagos. Com base nesses achados, entende-se que a Gal-1 está intimamente envolvida na regulação dos processo de migração e remoção fagocítica de neutrófilos por macrófagos de modo a favorecer a ocorrência de uma resposta inflamatória homeostática.

Palavras-chave: Galectina-1, *preaparesis*, homeostase neutrofílica, remoção fagocítica

## ABSTRACT

MESTRINER, L. **The role of galectin-1 on neutrophilic homeostasis.** 2022. 65f. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Phagocytic removal of neutrophils in inflamed tissues is a critical event of leukocyte homeostasis, and its failure is related to several diseases associated with the uncontrolled inflammatory response. Galectin-1 (Gal-1) is a multifunctional glycan-binding protein with anti-inflammatory properties, capable of inducing phosphatidylserine (PS) exposure on the surface of neutrophils, favoring its phagocytic recognition by macrophages *in vitro*. This protein is also associated with a shift in macrophage phenotype during the resolution of inflammation. However, the process of neutrophilic homeostasis is still not fully understood, and more studies are needed to better understand the role of Gal-1 in this process. In this study, the impact of mouse Gal-1 (endogenous and exogenous) on the induction of neutrophil removal by macrophages *in vitro* and *in vivo* was evaluated. Furthermore, we investigated the potential correlation of the Gal-1 gene (*Lgals1*) with genes related with macrophage phagocytosis pathways. Blood count and myelogram of wild-type C57BL/6 mice (*Lgals1*<sup>+/+</sup>) and Gal-1-deficient mice (*Lgals1*<sup>-/-</sup>) were performed in the absence of inflammation, and an increase in neutrophils' numbers in the blood and a reduction of mature-neutrophils' numbers in bone marrow of *Lgals1*<sup>-/-</sup> mice were observed. Thioglycolate (3%) was injected into the peritoneum of *Lgals1*<sup>+/+</sup> and *Lgals1*<sup>-/-</sup> mice, and the inflammatory site was washed at 4, 18 and 90 hours after stimulation to analyze the kinetics of neutrophil accumulation in the peritoneum. *Lgals1*<sup>-/-</sup> mice present a greater number of neutrophils at 4 and 18 hours, indicating a higher migration rate to the inflammatory site by these cells and a possible lower rate of phagocytic removal of these leukocytes by resident macrophages. *Lgals1*<sup>+/+</sup>-thymus cells were treated with recombinant mouse Gal-1 (Gal-1c) and incubated with *Lgals1*<sup>+/+</sup> or *Lgals1*<sup>-/-</sup> macrophages and analyzed by flow cytometry. The results indicated a higher phagocytic rate of *Lgals1*<sup>+/+</sup> macrophages. Analysis of public transcriptome data indicated that the *Lgals1* gene is differentially expressed in macrophages co-cultured with apoptotic lymphocytes compared to control macrophages. Furthermore, the increased expression of *Lgals1* in these macrophages showed a robust correlation with genes differentially expressed and involved in different pathways of macrophages' phagocytosis. Based on these findings, it is understood that Gal-1 is closely involved in the regulating neutrophils' migration and phagocytic removal of these leukocytes by macrophages, favoring a homeostatic inflammatory response.

Keywords: Galectin-1, preapoptosis, neutrophilic homeostasis, phagocytic removal.

**SUMÁRIO**

RESUMO.....	i
SUMÁRIO.....	iii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Aspectos gerais da resposta inflamatória e de sua regulação pela fagocitose de neutrófilos por macrófagos. ....	2
1.2. Galectina na homeostase neutrofílica .....	10
1.2.1. Gal-1 na migração de neutrófilos .....	13
1.2.2. Gal-1 na remoção fagocítica de neutrófilos.....	13
1.2.3. Gal-1 na mudança do fenótipo de macrófagos .....	15
<b>2. CONCLUSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>18</b>

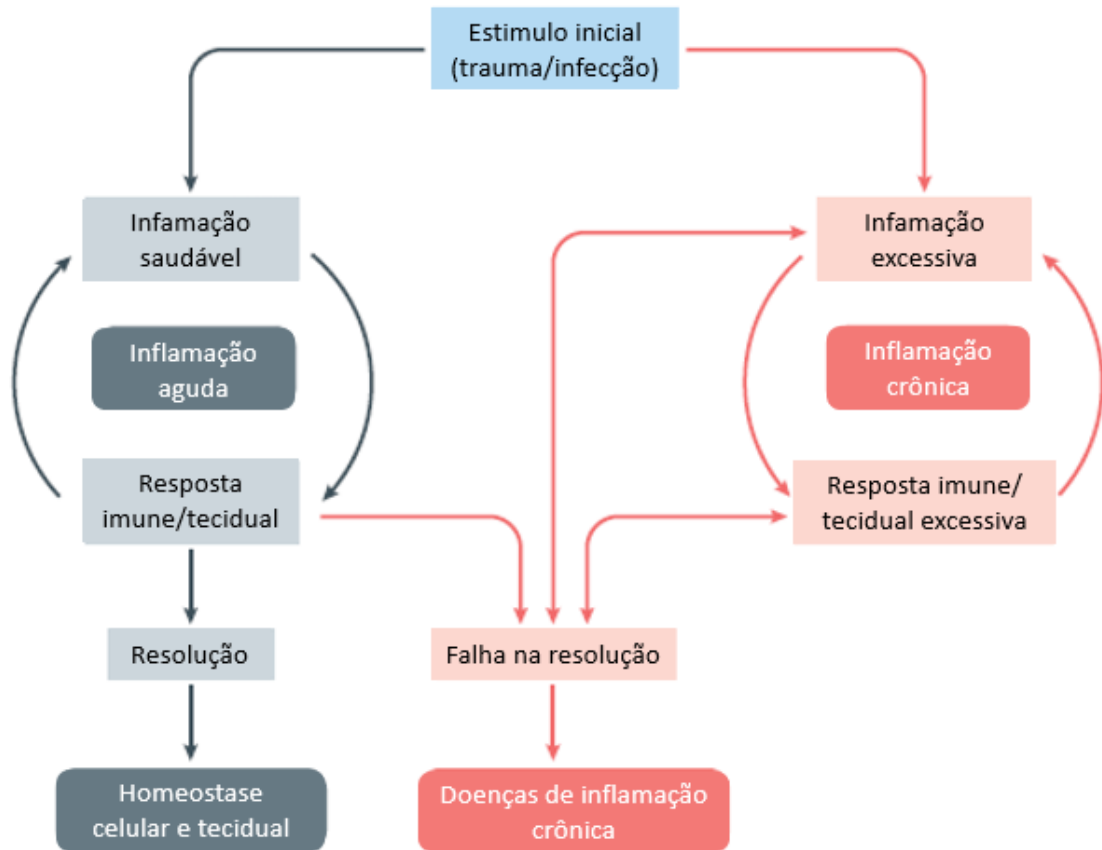
# **1. INTRODUÇÃO**



### 1.1. Aspectos gerais da resposta inflamatória e de sua regulação pela fagocitose de neutrófilos por macrófagos.

A inflamação (do Latim, *flamma*, chama, área em chamas e do Grego, *phlogosis*, fogo) (ROCHA E SILVA; GARCIA-LEMA, 2006) é uma resposta complexa e coordenada entre mediadores solúveis e células para a manutenção da homeostase tecidual em resposta a lesão ou infecção (MEDZHITOV, 2008; SUGIMOTO et al., 2019; MALENGIER-DEVILLES et al., 2021). Este importante evento da resposta imunológica é caracterizado como uma reação imediata do organismo a danos teciduais e celulares causados por patógenos; estímulos tóxicos, como produtos químicos, ou por lesão física como a irradiação. Em linhas gerais, a resposta inflamatória aguda envolve o acúmulo de componentes sanguíneos (plasma, mediadores bioativos e leucócitos), de modo coordenado, para o local da infecção ou lesão. Em condições fisiológicas, a sua resolução ocorre de modo eficiente e temporalmente adequado culminado na eliminação do agente nocivo e na restauração da homeostase tecidual (MEDZHITOV, 2008; SUGIMOTO et al., 2019; ANDERTON; WICKS; SILKE, 2020).

No entanto, falhas no controle da resposta a estes estímulos ou na resolução da inflamação inicial pode provocar respostas imunológicas e teciduais excessivas, amplificando a produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, mediadores lipídicos e de padrões moleculares associados a danos (DAMPs - do Inglês, *Damage-Associated Molecular Patterns*) (TEIJARO et al., 2013; ANDERTON; WICKS; SILKE, 2020). Essa inflamação prolongada pode provocar o comprometimento do processo de reparo tecidual, causar fibrose e disfunção de órgãos (UEHA; SHAND; MATSUSHIMA, 2012; GIESECK; WILSON; WYNN, 2018; LOYER et al., 2022). Assim, a resposta inflamatória não-homeostática pode estar associada a vários processos fisiopatológicos, como artrite reumatóide, câncer, asma, esclerose múltipla, obesidade, aterosclerose, doenças cardiovasculares, entre outras (Figura 1) (MEDZHITOV, 2008; NATHAN; DING, 2010; SPITE; CLÀRIA; SERHAN, 2014).



**Figura 1 - Inflamação aguda versus crônica.** Retirado e adaptado de ANDERTON; WICKS; SILKE, 2020.

A resolução da inflamação aguda local está associada com a eliminação de neutrófilos no sítio inflamatório por macrófagos e o consequente retorno do número de leucócitos à homeostase. Portanto, a desregulação da inflamação está intimamente associada à uma ineficiente remoção fagocítica de neutrófilos no sítio inflamatório (ARIEL; TIMOR, 2013; GREENLEE-WACKER, 2016; DALLI; SERHAN, 2017).

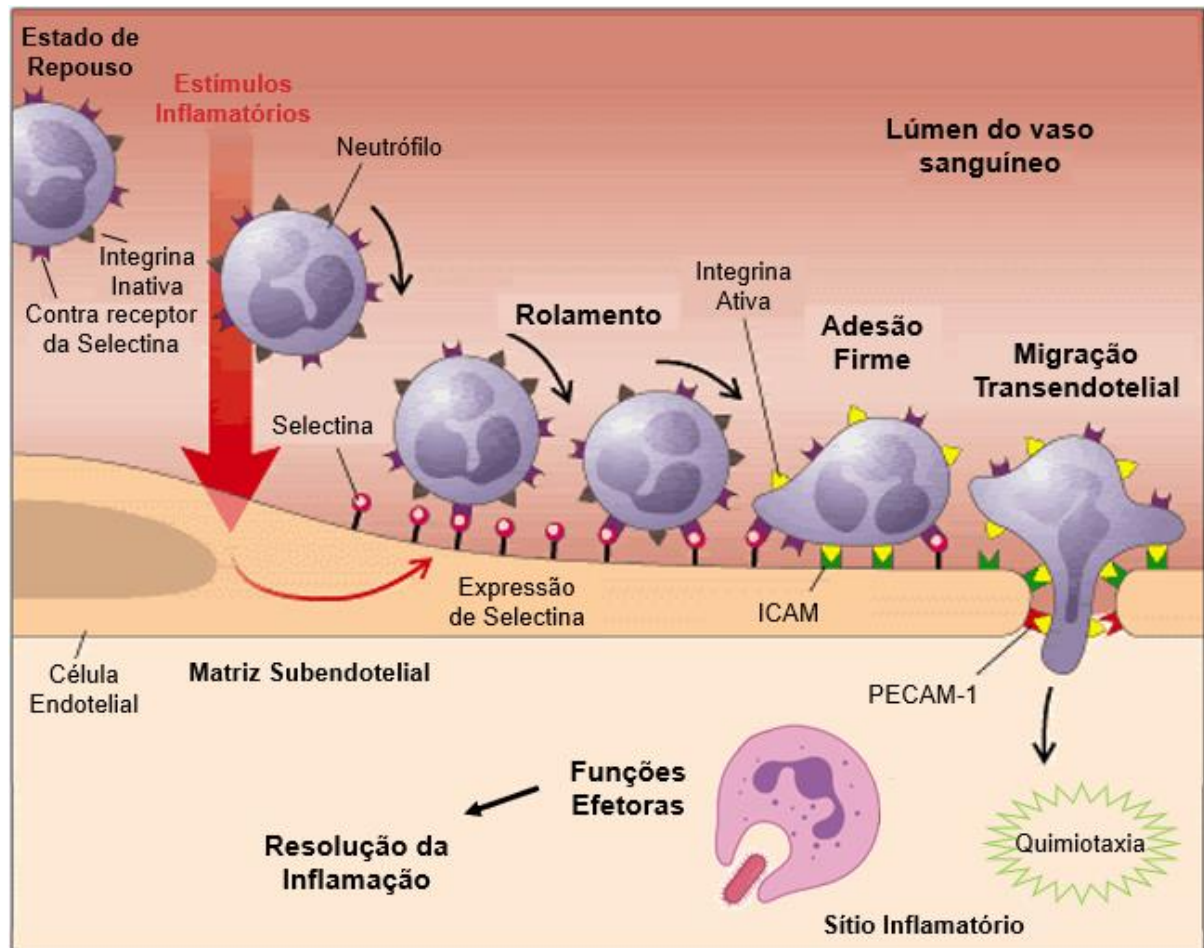
Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares (PMN) que participam da resposta inflamatória e são produzidos na medula óssea a partir de células-tronco hematopoéticas que originam o progenitor de granulócito-macrófago, o qual se diferencia em neutrófilos maduros. Em relação a capacidade proliferativa, as células da medula óssea associadas a produção de neutrófilo, podem ser divididas em três grupos: i) células que proliferaram (progenitor de granulócito-macrófago); ii) “pool mitótico” (promielócito e mielócitos) e iii) “pool pós-mitótico” (metamielócitos, bastonetes e segmentados). Ainda, os diferentes estágios do desenvolvimento de neutrófilos na medula óssea também são caracterizados por uma formação

sequencial de grânulos e vesículas, conforme a evolução do processo de maturação, iniciando com o surgimento de grânulos primários ou azurofílicos (arginase-1, CD63, defensinas, lisozima, mieloperoxidase e outros componentes), secundários ou específicos (CD15, CD66b, CD11b/CD18, lisozima, lactoferrina, metaloproteínase 8 flavocitocromo b558 e outros componentes), terciários ou gelatinase (arginase-1, gelatinase B, CD11b/CD18, flavocitocromo b558 e e outros componentes) e vesículas secretórias (fosfatase alcalina, CD10, CD35, flavocitocromo b558 e outros componentes) (MALENGIER-DEVLIES et al., 2021). O processo de desenvolvimento de neutrófilos ocorre em resposta a ações combinadas e integradas de citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição e pelo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF - do Inglês, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) (ROILIDES et al., 1991; MANZ; BOETTCHER, 2014). Em condições homeostáticas, os neutrófilos maduros podem ser estocados na medula óssea, antes de serem liberados para a circulação, e ainda podem ser armazenados em outros órgãos, como fígado, baço e rins (“*pool* marginal”). Durante o processo inflamatório, os neutrófilos circulantes migram e se acumulam em diferentes tecidos (“*pool* dos tecidos”) (MALENGIER-DEVLIES et al., 2021).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação nos mamíferos e caracterizados por apresentarem uma meia-vida curta na circulação sanguínea de camundongos e humanos, por volta de 12 horas e 6-8 horas, respectivamente (ATHENS et al., 1961; BASU et al., 2002; SUMMERS et al., 2010). Em condições homeostáticas e na ausência de inflamação ocorre à eliminação diária de um grande número de neutrófilos da ordem de  $10^7$  células/dia em camundongos e  $10^{11}$  células/dia em humanos, e este fato pode estar associado a remoção fagocítica, por macrófagos do estroma da medula óssea, de neutrófilos senescentes da circulação que migraram de volta para a medula óssea (SUMMERS et al., 2010) ou são eliminados por macrófagos residentes de tecidos periféricos (CASANOVA-ACEBES et al., 2013; MALENGIER-DEVLIES et al., 2021).

Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio de inflamação, provocada tanto por eventos infecciosos quanto por processos estéreis (ROCK et al., 2010). A migração neutrofilica é composta por várias etapas consecutivas obedecendo à uma coordenação temporal e espacial (WORTHYLAKE; BURRIDGE, 2001). O recrutamento e o acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório são disparados por lesão tecidual e/ou infecção, seguido da liberação de agentes

quimioatraentes (quimiocinas, componentes do sistema complemento, mediadores lipídicos e produtos microbianos, como peptídeos *N*-formilados), adesão neutrófilo-endotélio, mediada por selectinas e integrinas, migração transendotelial e ação efetora dos leucócitos no sítio inflamatório, como ilustrado na Figura 2 (KOBAYASHI et al., 2005; NICOLÁS-ÁVILA; ADROVER; HIDALGO, 2017).



**Figura 2 - Representação das etapas do recrutamento leucocitário em respostas inflamatórias.** Retirado e adaptado de ETZIONI, 2000.

Uma das principais funções efetoras de neutrófilos é a fagocitose de microorganismos, fato que desencadeia os eventos microbicidas dependentes da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS - do Inglês, *Reactive Oxygen Species*) e seus derivados (superóxidos, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radical hidroxila e cloraminas) ou não dependentes da geração de ROS, como degranulação, formação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs - do Inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) (MALENGIER-DEVLIÉS et al., 2021). Tais mecanismos efetores não são específicos para agentes nocivos e podem causar

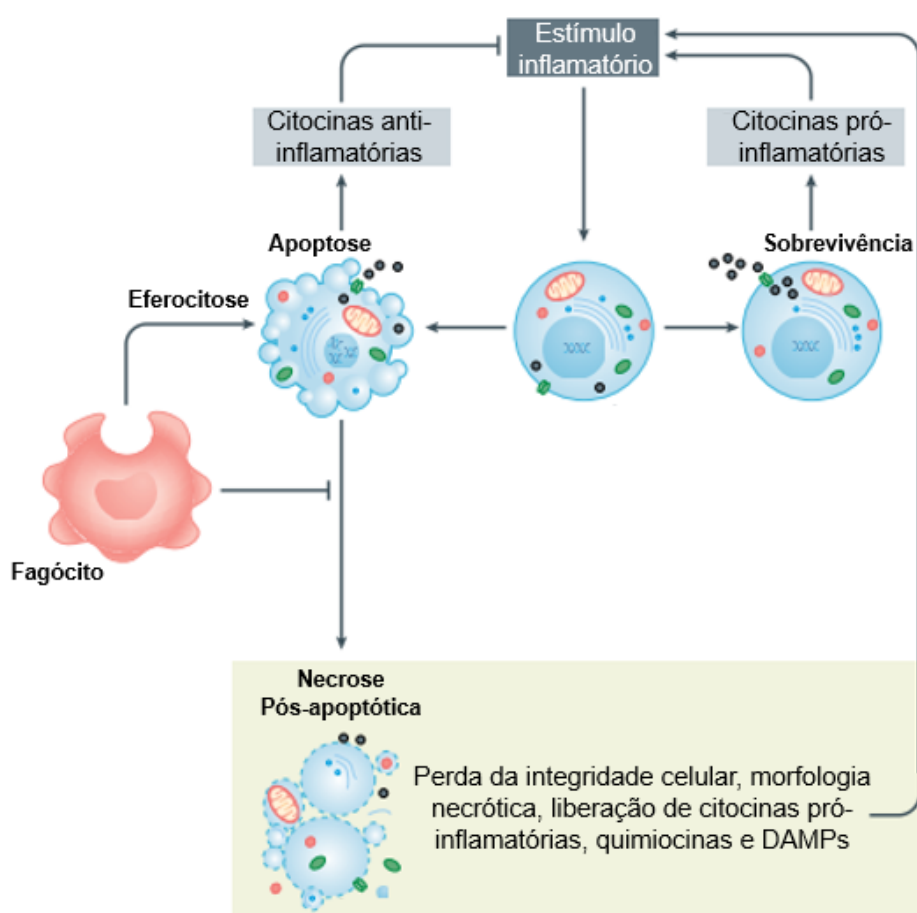
danos tecidual (PIZZA et al., 2005). Por outro lado, neutrófilos podem regular a produção de mediadores pró-inflamatórios (GRESNIGT et al., 2012) e contribuir para a resolução de inflamação aguda e manutenção da homeostase tecidual (JEROME et al., 2022).

Após a etapa de eliminação dos agentes nocivos do sítio de inflamação aguda, a eliminação dos neutrófilos é essencial para a regeneração tecidual, resolução do processo inflamatório e lesões, levando conseqüentemente à restauração da homeostase tecidual (JACOBSON; WEIL; RAFF, 1997; NICOLÁS-ÁVILA; ADROVER; HIDALGO, 2017; ARIENTI et al., 2019). Essa remoção dos neutrófilos é realizada via fagocitose, um fenômeno complexo não-inflamatório e que envolve o reconhecimento, a ingestão e a degradação de elementos celulares descartáveis, por fagócitos e células parenquimatosas (PARK; KIM, 2017; ARIENTI et al., 2019). Portanto, a desregulação da inflamação está intimamente associada a uma ineficiente remoção fagocítica de neutrófilos do sítio inflamatório e ao comprometimento da homeostase tecidual (ARIEL; TIMOR, 2013; GREENLEE-WACKER, 2016; DALLI; SERHAN, 2017).

Esse processo de remoção está geralmente associado ao processo de morte celular programada conhecido por apoptose, do grego *apoptosis* “queda das folhas das árvores”. Este evento é caracterizado pelo arredondamento celular, retração do citoplasma, condensação da cromatina e fragmentação de DNA e de células em corpos apoptóticos menores com membranas plasmáticas preservadas expressando fosfatidilserina (FS). Estas alterações morfológicas das células apoptóticas ocorrem por meio de um processo bioquímico complexo e multimediado composto por duas vias principais de sinalização: i) extrínseca, mediada pela interação entre receptores celulares de morte e seus ligantes extracelulares com os membros da família do TNF; ii) intrínseca ou mitocondrial, mediada por estímulos nocivos como irradiação ultravioleta, inanição e quimioterápicos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018). A ativação de um grupo de enzimas conhecidas por caspases (cisteínas específicas para ácido aspártico) é comum para as duas vias de sinalização do processo apoptótico. Basicamente, a ativação das caspases iniciadoras (8, 9 e 10) leva à ativação, dependente da clivagem, das caspases efetoras (3, 6 e 7) promotoras de clivagem generalizada de proteínas celulares (nucleares e citoesqueléticas) culminando na degradação de proteínas, DNA

cromossômico, fragmentação nuclear e exposição de FS em superfícies celulares (STRASSER; CONNOR; DIXIT, 2000; ELMORE, 2007).

O processo de fagocitose de células apoptóticas é designado eferocitose, do latim *effero*, que significa “transportar para o túmulo” (DECATHELINEAU; HENSON, 2003), e previne a progressão para apoptose tardia e necrose pós-apoptótica. A necrose pós-apoptótica é caracterizada pela ruptura da membrana plasmática e liberação descontrolada de DAMPs e citocinas inflamatórias no ambiente extracelular, perpetuando um ciclo de inflamação e morte celular, como esquematizado na Figura 3 (ANDERTON; WICKS; SILKE, 2020).



**Figura 3 - A morte celular é tanto causa quanto consequência da inflamação.** Retirado e adaptado de ANDERTON; WICKS; SILKE, 2020.

Recentemente foi descrito que, indivíduos saudáveis perdem por volta 200 bilhões de células por dia, principalmente, por meio do processo apoptótico e são rapidamente eliminadas por eferocitose (MORIOKA; MAUERÖDER; RAVICHANDRAN, 2019). A eferocitose ocorre pelo desencadeamento de três

etapas consecutivas, a primeira, é conhecida por “*find me*” (“encontre-me”) e mediada por agentes quimiotáticos que induzem a migração de fagócitos profissionais em direção à célula que está morrendo. A segunda etapa está associada a sinais designados “*eat me*” (“coma-me”) que são expostos na superfície da célula apoptótica e mediam o reconhecimento desta célula em processo de morte por fagócitos. Por fim, células e corpos apoptóticos são internalizados e degradados no compartimento fagolisossômico por proteases, DNAses e lipases (PARK; KIM, 2017). Geralmente, a geração dos sinais “*find me*” e “*eat me*” está associada ao processo apoptótico. Alguns dos sinais “*find me*” mais estudados são os nucleotídeos ATP e UTP (ELLIOTT et al., 2009), a quimiocina CX3CL1 (TRUMAN et al., 2008) e a ICAM3 (TORR et al., 2012). Os sinais “*eat me*” mais bem caracterizados expressos nas superfícies de células apoptóticas são a FS (KRAHLING et al., 1999) e a calreticulina (PANARETAKIS et al., 2009).

Apesar da crucial importância da associação entre apoptose e eferocitose na eliminação de resíduos celulares, vários dados da literatura reportam que estes eventos não são os únicos envolvidos na manutenção da homeostase tecidual. Nessa linha, foi demonstrado que camundongos deficientes nas caspases iniciadoras 2 e 9 (BERGERON et al., 1998; KUIDA et al., 1998) e caspases efetoras 3, 6 e 7 (KUIDA et al., 1996; ZANDY et al., 2005; LAKHANI et al., 2006) se desenvolvem e sobrevivem normalmente. Além disso, foi descrito que camundongos deficientes de Fas ou FasL não apresentam alterações na quantidade de neutrófilos circulantes (FECHO; BENTLEY; COHEN, 1998; FECHO; COHEN, 1998), indicando que os neutrófilos apresentam um mecanismo homeostático independente de apoptose.

Uma das moléculas envolvidas no reconhecimento fagocítico de leucócitos por macrófagos é a fosfatidilserina (FS), um fosfolípido localizado preferencialmente na lâmina interna da bicamada lipídica em células viáveis e é geralmente externalizada na superfície celular em resposta a estímulos apoptóticos (KRAHLING et al., 1999). A enzima translocase aminofosfolípido, à custo energético, transporta FS para a parte citosólica da célula, mantendo essa assimetria (SEIGNEURET; DEVAUXT, 1984; TANG et al., 1996). Uma vez que a célula entra em apoptose, a enzima translocase é inativada enquanto a enzima *scramblase*, responsável pelo transporte randômico de fosfolípidos pela bicamada da membrana plasmática, é ativada

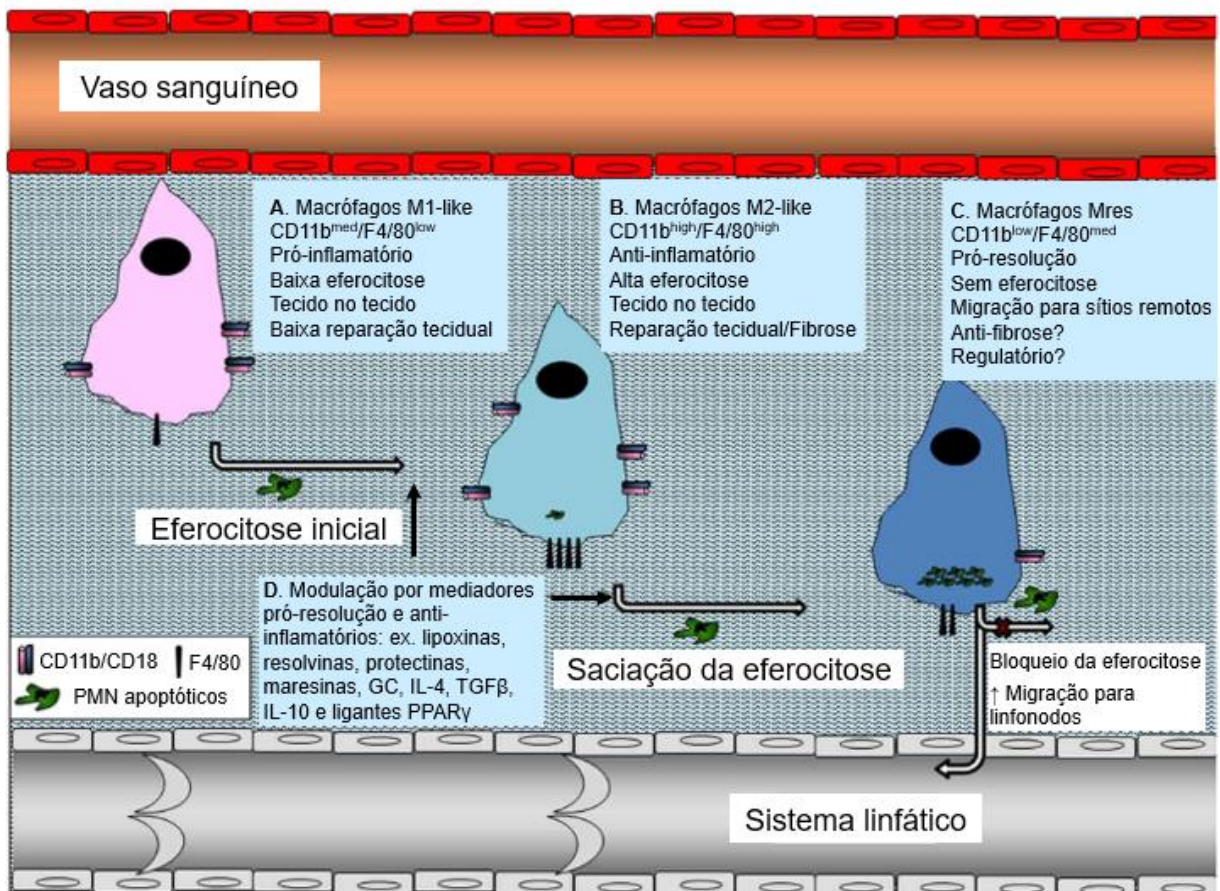
(BRATTON et al., 1997; WILLIAMSON; SCHLEGEL, 2002). Entretanto, em determinadas situações a exposição da FS na superfície celular não depende da enzima *scramblase* (BRATTON et al., 1997). Esses dois eventos requerem o aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico e evidenciam a exposição da FS na superfície celular (KARMAKARA; CUMMINGS; MCEVER, 2005). A remoção fagocítica dessas células se dá principalmente pelo reconhecimento de FS por macrófagos (ALLEN et al., 1991; WILLIAMSON; SCHLEGEL, 2002).

Há evidências de que a exposição de FS pode estar associada à fagocitose de células apoptóticas e necróticas por macrófagos (BROUCKAERT et al., 2004). A FS exposta nas superfícies celulares é reconhecida por vários receptores expressos nos fagócitos, incluindo TIM-1, TIM-3, TIM-4, BAI1, MerTK, estabilinas e CD36 (RIGOTTI; ACTON; KRIEGER, 1995; BERGERON et al., 1998; KOBAYASHI et al., 2007; NAKAYAMA et al., 2009; PARK et al., 2009). Curiosamente, já foram descritos eventos celulares onde a expressão de FS não está associada a apoptose, como a formação de miotubos (VAN DEN EIJNDE et al., 2001) e desgranulação de mastócitos (MARTIN et al., 2000). Além disso, outros dados mostraram que o reconhecimento fagocítico e engolfamento de células que expressam FS, por fagócitos, pode ser independente do processo apoptótico (ZHUANG et al., 1998).

Durante o processo de eferocitose, os macrófagos sofrem uma mudança de fenótipo, necessária para a eficiente remoção de células PMNs apoptóticas e posterior resolução da inflamação como ilustrado na Figura 4. Inicialmente monócitos infiltram o tecido inflamado, se diferenciam para macrófagos e adotam um fenótipo semelhante à M1 previamente ao encontro com células PMNs apoptóticas. Esse perfil é caracterizado pela baixa taxa de eferocitose, alta produção de citocinas e enzimas pró-inflamatórias (IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS) e baixa produção de citocinas e enzimas anti-inflamatórias (IL-10 e arginase). Uma vez que esses macrófagos encontram células PMNs e dão início ao engolfamento das mesmas (eferocitose inicial), ocorre uma mudança do fenótipo desses macrófagos para um perfil semelhante à M2, caracterizado pela alta taxa de eferocitose, perfil anti-inflamatório (redução de IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS e aumento de IL-10 e arginase) e envolvimento na reparação tecidual e retorno da homeostase. À medida que a fagocitose de células PMNs apoptóticas continua, o macrófago sofre



uma mudança de M2 para macrófagos “saciados” (promotores da resolução - Mres), caracterizados pela redução da taxa de fagocitose, aumento da expressão de arginase e de 12/15-lipoxigenase (12/15-LO), os produtos dessa enzima estão associados com a propriedade anti-inflamatória e pró-resolução desses macrófagos. Mres podem atuar no tecido inflamado ou migrar para órgãos linfáticos, onde fornecem sinais homeostáticos para células apresentadoras de antígenos e linfócitos (SCHIF-ZUCK et al., 2011; ARIEL; SERHAN, 2012).



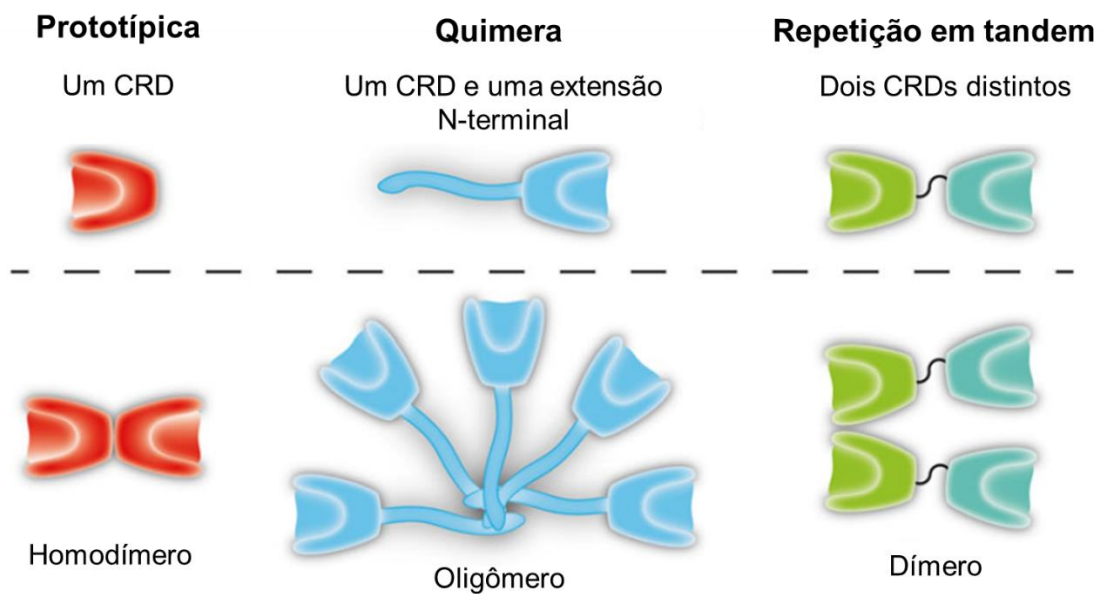
**Figura 4 - Conversões de fenótipos de macrófagos induzidas por eferocitose.** Retirado e adaptado de (ARIEL; SERHAN, 2012).

## 1.2. Galectina na homeostase neutrofílica

As galectinas (Gal) são moléculas multifuncionais do hospedeiro que participam de vários processos fisiológicos como embriogênese; diferenciação, migração e ativação celular; homeostase leucocitária e regulação das respostas imunológicas inata e adaptativa (ARTHUR et al., 2015a). Essas proteínas também

são relacionadas com doenças como câncer, fibrose, distúrbios cardíacos e doenças inflamatórias (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018).

Estas moléculas são classificadas como proteínas solúveis ligadoras de carboidratos (lectinas) contendo  $\beta$ -galactosídeos, e são reunidas em três grupos conforme seus aspectos estruturais (Figura 5): prototípicas (Gal -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, e -14), quimérica (Gal-3) e “Tanden Repeats” (Gal-4, -8, -9 e -12). As duas primeiras apresentam somente um Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD), podendo existir na forma de monômeros ou homodímeros. A Gal-3 é a única representante da forma quimérica, apresentando apenas um domínio CRD e uma extensão N-terminal sem atividade lectínica. Já as galectinas do tipo *Tanden Repeats* possuem dois CRDs: um localizado na região C-terminal e outro na N-terminal, com afinidades distintas a carboidratos e conectados por um oligopeptídeo.

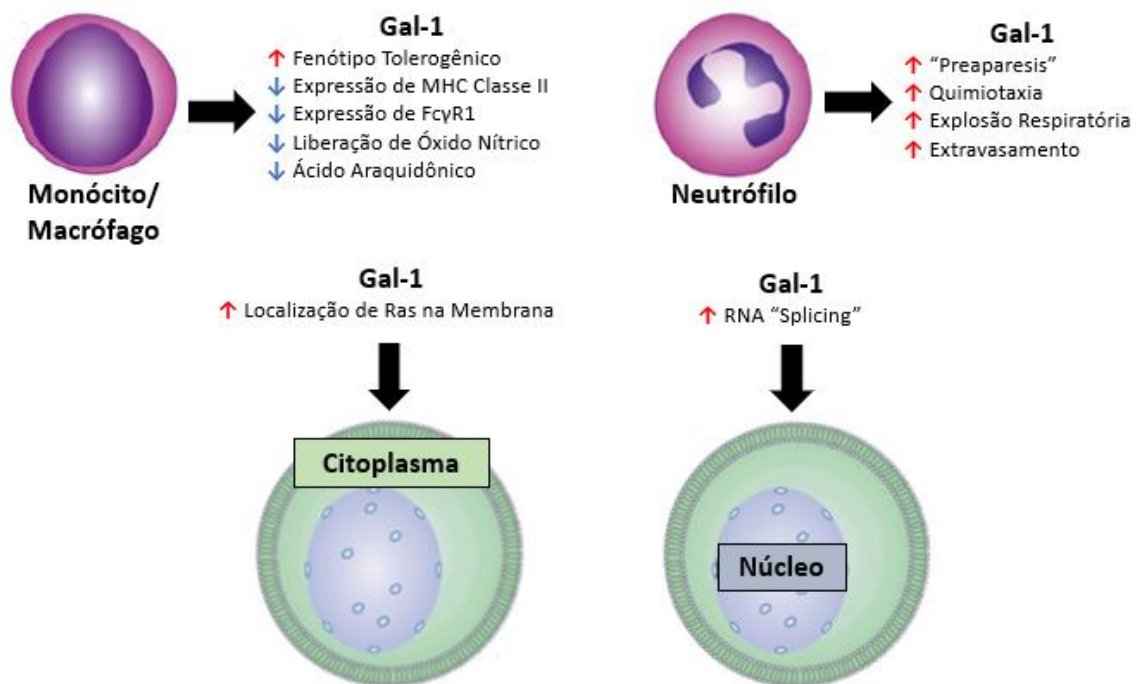


**Figura 5 - Representação gráfica dos membros da família das Galectinas e de seus Domínios de Reconhecimento de Carboidratos (CRD).** Adaptado de ARTHUR et al., 2015

A Gal-1 de origem humana (Gal-1h) e de camundongo (Gal-1c) são proteínas ácidas de 135 aminoácidos codificadas pelo gene LGALS1, localizado no cromossomo 22q12 e pelo gene Lgals1 no cromossomo 15 respectivamente. As formas monoméricas destas galectinas apresentam massa molecular aproximada de 15 kDa que se associam em dímeros por meio de interações não-covalentes. O dímero de Gal-1 em seu estado reduzido é o principal agente desencadeador das funções biológicas descritas para Gal-1 humana e murina (CAMBY et al., 2006;

LOHR et al., 2007).

Essa proteína multifuncional participa de diversos processos, desde os mais simples, até participação em vias de sinalização complexas e elaboradas. A Gal-1 pode participar de eventos antagônicos em diferentes tipos celulares, como iniciadora de apoptose, inibindo o crescimento de células do sistema imune, ou como mitógeno, estimulador da proliferação, para células do baço, linfócitos e células endoteliais. A interação da Gal-1 com os seus ligantes pode promover, ainda, atividades intra e extracelulares, como regulação de influxo de cálcio, “RNA splicing”, autofagia, funções mitocondriais, entre outras (Figura 6) (LIPSICK et al., 1980; DIAS-BARUFFI et al., 1995; PERILLO et al., 1995; RABINOVICH et al., 1998; TOSCANO et al., 2007; ANGINOT et al., 2013).



**Figura 6 - Funções da Gal-1 em monócitos/macrófagos, neutrófilos, citoplasma e núcleo celular.** Adaptado de ARTHUR et al., 2015.

A remoção fagocítica dos neutrófilos do tecido inflamado é mediada por dois principais agentes, neutrófilos ativados e efetores, e macrófagos, como agentes fagocíticos. A Gal-1 está associada com a regulação de ambas as células, exercendo influência, positiva ou negativa, na migração e exposição de FS nos neutrófilos e mudanças no fenótipo dos macrófagos como será apresentado nos tópicos seguintes.

### 1.2.1. Gal-1 na migração de neutrófilos

A Gal-1 pode exercer papéis antagônicos no processo de recrutamento de neutrófilos. A interação da Gal-1 com uma glicana da superfície de neutrófilos (sialoglicoproteína - CD43) resulta na migração destes leucócitos, *in vitro* e *in vivo*, em condições não-inflamatórias (AUVYNET et al., 2013). Por outro lado, a Gal-1 pode inibir a migração de neutrófilos para o foco inflamatório, diminuindo os processos de quimiotaxia, rolamento, adesão e transmigração de neutrófilos pela monocamada endotelial (LA et al., 2003; COOPER; NORLING; PERRETTI, 2008).

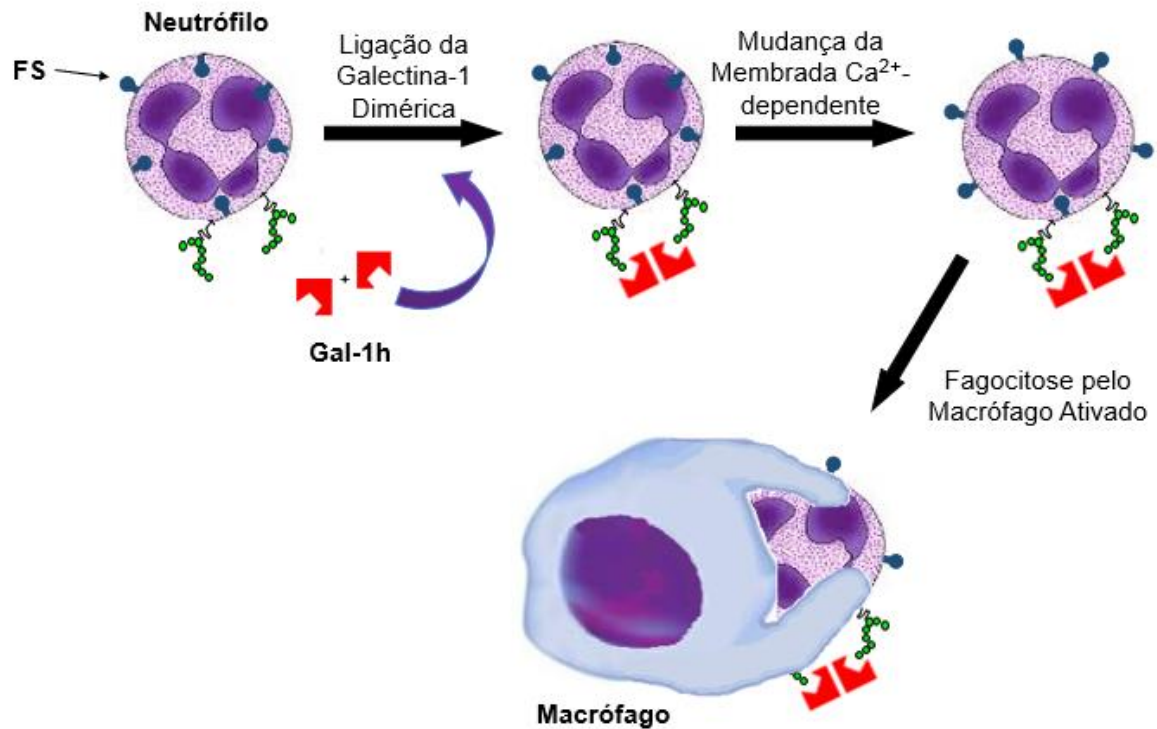
Após ativado por estímulos inflamatórios, o endotélio expressa selectinas, que se ligam à receptores presentes nos neutrófilos, dando o início ao processo de rolamento e adesão fraca desses leucócitos às células endoteliais do vaso sanguíneo. Com a continuidade do processo de rolamento, as integrinas presentes na membrana celular dos neutrófilos se tornam ativas e se ligam à moléculas de adesão endoteliais, permitindo uma adesão firme e estacionária dessas células ao vaso (ETZIONI, 2000). Em modelo de peritonite aguda foi demonstrado que o tratamento com Gal-1h exógena é capaz de diminuir a expressão de e  $\beta$ 2-integrina em neutrófilos, reduzindo o índice de adesão dessas células ao endotélio (GIL; GULLO; OLIANI, 2011).

### 1.2.2. Gal-1 na remoção fagocítica de neutrófilos

Como dito anteriormente, existem relatos de que os neutrófilos podem ser removidos do sítio inflamatório por mecanismos independentes do processo apoptótico. Essa hipótese foi comprovada com estudos que demonstraram que a Gal-1h é capaz de induzir a exposição de FS na membrana de neutrófilos e células HL-60 (linhagem promielocítica humana), assim como a consequente indução da fagocitose dessas células por macrófagos. Apesar da FS poder ser um marcador de apoptose, este efeito da Gal-1h ocorre na ausência deste processo de morte celular, fato que preserva as funções efetoras de neutrófilos, fenômeno conhecido como *preapoptosis* (neutrófilo preparado para ser fagocitado), representado na Figura 7 (DIAS-BARUFFI et al., 2003). As Gal-2, -3, -4 e -9 também induzem a exposição de FS na superfície de neutrófilos, mas somente a Gal-2 e Gal-4 são capazes de

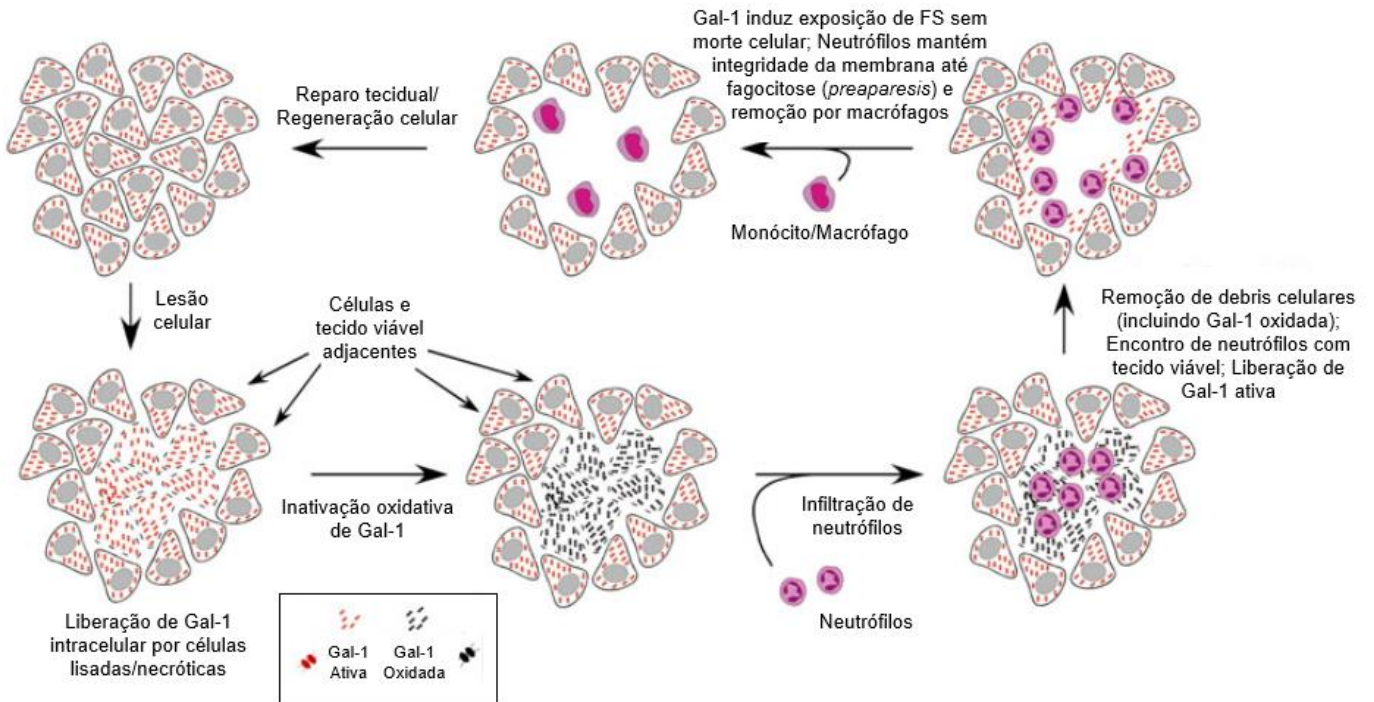
induzir FS na ausência de apoptose, como a Gal-1 (STOWELL et al., 2008, 2009).

O processo de *preapoptosis* induzido por Gal-1h é reversível e já foi observado em outros leucócitos. Além disso, depende do reconhecimento de glicanas na superfície celular, da oligomerização dessa proteína e da mobilização intracelular de cálcio (KARMAKARA; CUMMINGS; MCEVER, 2005; STOWELL et al., 2007, 2008, 2009).



**Figura 7 - Representação da *preapoptosis*.**

Os neutrófilos, ao infiltrarem o tecido danificado, desempenham suas funções sem que o processo de *preapoptosis* seja iniciado, uma vez que entram em contato somente com Gal-1 extracelular, que é oxidada e inativa. Entretanto, quando os neutrófilos começam a danificar tecido íntegro, a Gal-1 intracelular, reduzida e ativa, é liberada desencadeando o processo de *preapoptosis* com exposição de FS em suas superfícies, para posterior remoção fagocítica por macrófagos sem a perda de viabilidade da membrana celular dos neutrófilos (Figura 8) (ARTHUR et al., 2015b).



**Figura 8 - Esquema da participação da Gal-1 reduzida e oxidada na *preaparesis* de neutrófilos.** Adaptado de (ARTHUR et al., 2015b).

### 1.2.3. Gal-1 na mudança do fenótipo de macrófagos

A Gal-1 tem a capacidade de inibir a via clássica de ativação macrofágica (perfil M1), diminuindo a expressão de iNOS e conseqüente redução na produção de NO, moléculas pró-inflamatórias; concomitantemente, essa proteína favorece a via alternativa de ativação (perfil M2), na qual ocorre o aumento da atividade da enzima arginase, um mediador anti-inflamatório (CORREA et al., 2003). Como apresentado anteriormente, os macrófagos com perfil M2 apresentam um maior índice de fagocitose, podendo ser inferido que a Gal-1 está indiretamente associada a um aumento do índice fagocítico de macrófagos.

A Gal-1 também favorece o aumento da expressão da enzima 12/15-LO, que é responsável pela produção de mediadores lipídicos associados à resolução da inflamação, característica de macrófagos Mres (YASEEN et al., 2020). Dessa forma é possível dizer que a Gal-1 está intimamente associada a mudança no fenótipo de macrófagos e conseqüente resolução da inflamação.

Mesmo com todos esses estudos, existem lacunas quando a participação da Gal-1 endógena na restauração da homeostase celular.

## **2. CONCLUSÃO**

- As preparações das proteínas recombinantes Gal-1h, Gal-1c, AnxV-FITC e AnxV-<sup>99m</sup>Tc obtidas estavam homogêneas e ativas.
- A produção de células THP-1 *knockdown* para o gene da Gal-1 foi eficiente.
- Camundongos C57BL/6 *Lgals1*<sup>-/-</sup> apresentam uma menor quantidade de neutrófilos maduros na medula óssea e uma maior quantidade desses leucócitos no sangue.
- Camundongos C57BL/6 *Lgals1*<sup>-/-</sup> apresentam um maior acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório, e este fenômeno pode estar associado a uma maior migração e menor remoção fagocítica desses leucócitos.
- Macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 *Lgals1*<sup>+/+</sup> apresentam um maior poder fagocítico do que macrófagos *Lgals1*<sup>-/-</sup>.
- Ensaio *in silico* foram capazes de mostrar que macrófagos co-cultivados com células apoptóticas apresentaram uma maior expressão de mRNA da Gal-1 e este evento mostrou uma significativa correlação com DEGs de diferentes vias do processo fagocítico de macrófagos.

Entende-se que a Gal-1 pode apresentar um papel relevante na regulação da homeostase de neutrófilos, *in vitro* e *in vivo*, por meio de uma ação combinada envolvendo a modulação da migração desses leucócitos para o sítio inflamatório, e de seu potencial envolvimento em vias biológicas relacionadas ao processo de fagocitose de macrófagos.



### **3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALLEN, T. M. et al. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages : influence of liposome composition and size. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 56–64, 1991.
- ANDERTON, H.; WICKS, I. P.; SILKE, J. Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 9, p. 496–513, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41584-020-0455-8>>.
- ANGINOT, A. et al. Galectin 1 Modulates Plasma Cell Homeostasis and Regulates the Humoral Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 11, p. 5526–5533, 2013.
- ARIEL, A.; SERHAN, C. N. New lives given by cell death: Macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–6, 2012.
- ARIEL, A.; TIMOR, O. Hanging in the balance: Endogenous anti-inflammatory mechanisms in tissue repair and fibrosis. **Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 250–263, 2013.
- ARIENTI, S. et al. Regulation of apoptotic cell clearance during resolution of inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. JULY, p. 1–12, 2019.
- ARTHUR, C. M. et al. Evolving Mechanistic Insights into Galectin Functions. In: **Methods Molecular Biology**. [s.l: s.n.]p. 1–37.
- ARTHUR, C. M. et al. Detection of Phosphatidylserine Exposure on Leukocytes Following Treatment with Human Galectins. In: STOWELL, S. R.; CUMMINGS, R. D. (Ed.). **Galectins: Methods and Protocols**. 1. ed. [s.l: s.n.]p. 185–200.
- ASAMAPHAN, P.; BROWN, G. D.; WILMENT, J. A. Quantifying Receptor-Mediated Phagocytosis and Inflammatory Responses to Fungi in Immune Cells. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]p. 155–178.
- ATHENS, J. W. et al. Leukokinetic Studies. IV. The Total Blood, Circulating and Marginal Granulocyte Pools and the Granulocyte Turnover Rate in Normal Subjects. **Journal of Clinical Investigation**, n. 2, p. 989–995, 1961.
- AUVYNET, C. et al. Galectin-1 promotes human neutrophil migration. **Glycobiology**, v. 23, n. 1, p. 32–42, 2013.
- BASU, S. et al. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 854–861, 2002.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.
- BERGERON, L. et al. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. **Genes and Development**, v. 12, n. 9, p. 1304–1314, 1998.
- BRATTON, D. L. et al. Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 42, p. 26159–26165, 1997.
- BROUCKAERT, G. et al. Maintaining the Shape of Nerve Cells □. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. December, p. 5069–5081, 2004.
- BRÜHL, H. et al. Post-translational and cell type-specific regulation of CXCR4 expression by cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 11, p. 3028–3037, 2003.
- CAMBY, I. et al. Galectin-1: A small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, p. 1–21, 2006.
- CARBON, S. et al. The Gene Ontology resource: Enriching a GOld mine. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D325–D334, 2021.

CASANOVA-ACEBES, M. et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. **Cell**, v. 153, p. 1025–1035, 2013.

COOPER, D.; NORLING, L. V.; PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 6, p. 1459–1466, 2008.

CORREA, S. G. et al. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. **Glycobiology**, v. 13, n. 2, p. 119–128, 2003.

DALLI, J.; SERHAN, C. N. Pro-resolving mediators in regulating and conferring macrophage function. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 1–9, 2017.

DAVID, S.; KRONER, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 388–399, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3053>>.

DECATHELINÉAU, A. M.; HENSON, P. M. The final step in programmed cell death: Phagocytes carry apoptotic cells to the grave. **Essays in Biochemistry**, v. 39, p. 105–117, 2003.

DIAS-BARUFFI, M. et al. Biological characterization of purified macrophage-derived neutrophil chemotactic factor. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 263–269, 1995.

DIAS-BARUFFI, M. et al. Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without Inducing Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41282–41293, 2003.

DOS SANTOS, S. N. et al. Galectin-3 acts as an angiogenic switch to induce tumor angiogenesis via Jagged-1/Notch activation. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 49484–49501, 2017.

ELLIOTT, M. R. et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 282–286, 2009.

ELLIOTT, M. R. et al. Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells in vivo. **Nature**, v. 467, n. 7313, p. 333–337, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature09356>>.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ETZIONI, A. Integrins: The molecular glue of life. **Hospital Practice**, v. 35, n. 3, p. 102–111, 2000.

FECHO, K.; BENTLEY, S. A.; COHEN, P. L. Mice deficient in Fas ligand (gld) or Fas (lpr) show few alterations in granulopoiesis. **Cellular Immunology**, v. 188, n. 1, p. 19–32, 1998.

FECHO, K.; COHEN, P. L. Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 3, p. 373–383, 1998.

FOCK, R. A. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação do receptor de LPS (CD14/TLR4) e do fator de transcrição NFκB.** 2005. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2005.

GENE, T.; CONSORTIUM, O. Gene Ontology : tool for the. **Gene Expression**, v. 25, n. may, p. 25–29, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802651>>.

GIESECK, R. L.; WILSON, M. S.; WYNN, T. A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 1, p. 62–76, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.90>>.

GIL, C. D.; GULLO, C. E.; OLIANI, S. M. Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: Modulation of cytokine levels and adhesion molecules. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 4, n. 1, p. 74–84, 2011.

- GREENLEE-WACKER, M. C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 357–370, 2016.
- GRESNIGT, M. S. et al. Neutrophil-Mediated Inhibition of Proinflammatory Cytokine Responses. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 10, p. 4806–4815, 2012.
- GROMMES, C. et al. Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. **Journal of NeuroImmune Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 130–140, 2008.
- JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed Cell Death in Animal Development. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 347–354, 1997.
- JAGGI, U. et al. Increased phagocytosis in the presence of enhanced M2-like macrophage responses correlates with increased primary and latent HSV-1 infection. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, p. 1–25, 2020.
- JEROME, A. D. et al. Characterization of Zymosan-Modulated Neutrophils With Neuroregenerative Properties. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. May, p. 1–13, 2022.
- JING, J. et al. Role of Macrophage Receptor with Collagenous Structure in Innate Immune Tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 12, p. 6360–6367, 2013.
- JOHANNES, L.; JACOB, R.; LEFFLER, H. Galectins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 9, p. 1–9, 2018.
- KARMAKARA, S.; CUMMINGS, R. D.; MCEVER, R. P. Contributions of Ca<sup>2+</sup> to galectin-1-induced exposure of phosphatidylserine on activated neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28623–28631, 2005.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis : a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.
- KINSELLA, R. J. et al. Ensembl BioMarts: A hub for data retrieval across taxonomic space. **Database**, v. 2011, p. 1–9, 2011.
- KNUTH, A. K. et al. Apoptotic cells induce proliferation of peritoneal macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–17, 2021.
- KOBAYASHI, N. et al. TIM-1 and TIM-4 Glycoproteins Bind Phosphatidylserine and Mediate Uptake of Apoptotic Cells. **Immunity**, v. 27, n. 6, p. 927–940, 2007.
- KOBAYASHI, S. D. et al. Neutrophils in the innate immune response. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 53, n. 6, p. 505–517, 2005.
- KRAHLING, S. et al. Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 2, p. 183–189, 1999.
- KUIDA, K. et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. **Nature**, 1996.
- KUIDA, K. et al. Reduced apoptosis and cytochrome C-mediated caspase activation in mice lacking Caspase 9. **Cell**, v. 94, n. 3, p. 325–337, 1998.
- LA, M. et al. A novel biological activity for galectin-1: Inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 4, p. 1505–1515, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63507-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63507-9)>.
- LAKHANI, S. A. et al. Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 847–851, 2006.
- LAW, H. L. et al. A Pro-resolving Role for Galectin-1 in Acute Inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n.

March, p. 1–9, 2020.

LIPSICK, J. S. et al. Lectins from Chicken Tissues are Mitogenic for THY-1 Negative Murine Spleen Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 97, n. 1, p. 56–61, 1980.

LOHR, M. et al. Murine homodimeric adhesion/growth-regulatory galectins-1, -2 and -7: Comparative profiling of gene/promoter sequences by database mining, of expression by RT-PCR/immunohistochemistry and of contact sites for carbohydrate ligands by computational chemistr. **Folia Biologica**, v. 53, n. 4, p. 109–128, 2007.

LOKAR, M. et al. Agglutination of like-charged red blood cells induced by binding of  $\beta$ 2-glycoprotein I to outer cell surface. **Bioelectrochemistry**, v. 73, n. 2, p. 110–116, 2008.

LORD, B. I. et al. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 23, p. 9499–9503, 1989.

LOYER, C. et al. Impairment of neutrophil functions and homeostasis in COVID-19 patients: association with disease severity. **Critical Care**, v. 26, n. 1, p. 1–16, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13054-022-04002-3>>.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 1469–1478, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>>.

MALENGIER-DEVILIES, B. et al. Neutrophil Homeostasis and Emergency Granulopoiesis: The Example of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. December, p. 1–31, 2021.

MANZ, M. G.; BOETTCHER, S. Emergency granulopoiesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 302–314, 2014.

MARTIN, S. et al. Immunologic stimulation of mast cells Leads to the reversible exposure of phosphatidylserine in the absence of apoptosis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, n. 3, p. 249–258, 2000.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MIURA, T. et al. Galectin-1 $\beta$ , a natural monomeric form of galectin-1 lacking its six amino-terminal residues promotes axonal regeneration but not cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, n. 10, p. 1076–1083, 2004.

MORIOKA, S.; MAUERÖDER, C.; RAVICHANDRAN, K. S. Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology. **Immunity**, v. 50, n. 5, p. 1149–1162, 2019.

NAKAYAMA, M. et al. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3821–3830, 2009.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>>.

NICOLÁS-ÁVILA, J. Á.; ADROVER, J. M.; HIDALGO, A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. **Immunity**, v. 46, p. 15–28, 2017.

PANARETAKIS, T. et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. **EMBO Journal**, v. 28, n. 5, p. 578–590, 2009.

PARK, S. Y. et al. Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 18, p. 3365–3373, 2009.

PARK, S. Y.; KIM, I. S. Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 5, p. e331-10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emm.2017.52>>.

PERILLO, N. L. et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 736–739, 1995.

- PERILLO, N. L. et al. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 10, p. 1851–1858, 1997. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/185/10/1851/25204/Galectin-1-an-Endogenous-Lectin-Produced-by-Thymic>>.
- PIZZA, F. X. et al. Neutrophils contribute to muscle injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice. **Journal of Physiology**, v. 562, n. 3, p. 899–913, 2005.
- QIN, W. et al. Knockout of SLAMF8 attenuates collagen-induced rheumatoid arthritis in mice through inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 108644, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108644>>.
- RABINOVICH, G. A. et al. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. **Journal of immunology**, v. 160, n. 10, p. 4831–40, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590230>>.
- RICHARDS, M. K. et al. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3562–3568, 2003.
- RIGOTTI, A.; ACTON, S. L.; KRIEGER, M. **The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids** **Journal of Biological Chemistry**, 1995. .
- ROCHA E SILVA, M.; GARCIA-LEMA, J. Natural History of the Inflammatory Reaction. In: **Chemical mediators of the acute inflammatory reaction**. [s.l.: s.n.]p. 1–47.
- ROCK, K. L. et al. The sterile inflammatory response Kenneth. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 321–342, 2010.
- ROILIDES, E. et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. **Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 579–583, 1991.
- SANTOS, E. W. et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 138–145, 2016.
- SCHIF-ZUCK, S. et al. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b<sup>low</sup> macrophages: Modulation by resolvins and glucocorticoids. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 366–379, 2011.
- SEIGNEURET, M.; DEVAUXT, P. F. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane : Relation to shape changes. **Cell Biology**, v. 81, n. June, p. 3751–3755, 1984.
- SPITE, M.; CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 21–36, 2014.
- STARK, M. A. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 285–294, 2005.
- STOWELL, S. R. et al. Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 219–227, 2007.
- STOWELL, S. R. et al. Differential Roles of Galectin-1 and Galectin-3 in Regulating Leukocyte Viability and Cytokine Secretion. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 3091–3102, 2008.
- STOWELL, S. R. et al. Galectin-1 Induces Reversible Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p. 1408–1418, 2009.
- STRASSER, A.; CONNOR, L. O.; DIXIT, V. M. Apoptosis Signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 217–245, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966458>>.
- SUGIMOTO, M. A. et al. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 212–227, 2019.

- SUMMERS, C. et al. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 8, p. 318–324, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>>.
- TAMEGAI, H. et al. Aureobasidium pullulans culture supernatant significantly stimulates R-848-activated phagocytosis of PMA-induced THP-1 macrophages. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, n. 4, p. 455–461, 2013.
- TANG, X. et al. A Subfamily of P-Type ATPases with Aminophospholipid Transporting Activity. **Science**, v. 272, n. June, p. 7–10, 1996.
- TEIJARO, J. R. et al. Persistent LCMV Infection Is Controlled by Blockade of Type I Interferon Signaling. **Science**, v. 340, n. April, p. 27–29, 2013.
- TORR, E. E. et al. Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 4, p. 671–679, 2012.
- TOSCANO, M. A. et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. **Nature Immunology**, v. 8, n. 8, p. 825–834, 2007.
- TRABUCO, A. C. **Análise comparativa entre galectinas-1 humana e de camundongo sob os aspectos biológico e molecular**. 2013. 2013.
- TRUMAN, L. A. et al. CX3CL 1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 5026–5036, 2008.
- UEHA, S.; SHAND, F. H. W.; MATSUSHIMA, K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. APR, p. 1–6, 2012.
- VAN DEN EIJNDE, S. M. et al. Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 20, p. 3631–3642, 2001.
- VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. 2nd editio ed. [s.l: s.n.]
- WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R. A. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1585, p. 53–63, 2002.
- WORTHYLAKE, R. A.; BURRIDGE, K. Leukocyte transendothelial migration: Orchestrating the underlying molecular machinery. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 569–577, 2001.
- YASEEN, H. et al. Galectin-1 Facilitates Macrophage Reprogramming and Resolution of Inflammation Through IFN- $\beta$ . **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. June, p. 1–17, 2020.
- YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, n. March, p. 173090, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>>.
- ZANDY, A. J. et al. Role of the executioner caspases during lens development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30263–30272, 2005.
- ZHUANG, J. et al. Dissociation of phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis from other features of the apoptotic program. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15628–15632, 1998.

