

JULIA DIAS DA SILVA

**PAPEL DO RECEPTOR *MET* NA VIABILIDADE DE
NEUTRÓFILOS EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO
AGUDA**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Julho 2017

JULIA DIAS DA SILVA

**PAPEL DO RECEPTOR *MET* NA VIABILIDADE DE
NEUTRÓFILOS EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO
AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título em ciências com ênfase em Biologia Celular.

Orientador: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

2017

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Milton e Francisca, a minhas irmãs Samara e Juliana, ao meu Tio Fernando e ao meu marido Rafael, que sempre me incentivaram nessa jornada, obrigada por tudo! Vocês são meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui e por sempre estar comigo.

A minha família e ao meu marido, muito obrigada pelo incentivo, apoio, carinho e por sempre estarem comigo em todos os momentos.

A professora Vanessa Pinho por ter me dado a oportunidade de fazer parte da sua equipe e pelos ensinamentos.

Ao Flávio por ter me auxiliado bastante nesse trabalho e pelos ensinamentos.

A Alesandra por ter me ensinado grande parte do que eu sei hoje, por dividir madrugadas de experimentos comigo, tristezas de experimentos que não deram certo e felicidades daqueles que deram e pelas caronas também. Em fim em você eu encontrei uma grande amizade, obrigada por tudo. Este trabalho também é seu!

A Jessica pelas madrugadas de experimentos, por ter me disponibilizado a sua casa, pelas ideias de experimentos que criamos juntas, obrigada por tudo. Você chegou assim de mansinho para acompanhar meus experimentos e acabou se tornando uma grande amiga.

Ao walyson por ter me ensinado várias técnicas, por me ajudar em experimentos, pelos conselhos e a amizade.

A Ana e ao Gabriel que foram muito presentes no meu trabalho, sempre pude contar com vocês, muito obrigada por tudo.

A Rosália que me ajudou em algumas técnicas e se tornou uma grande amiga, muito obrigada por tudo.

A Erika que de uma forma ou de outra esteve sempre presente na minha vida me auxiliando e me dando muita força, obrigada.

Ao William por ter me ensinado uma técnica que jamais pensei que conseguiria fazer o W.B, muito obrigada pela paciência que você teve comigo.

A Lívia pela amizade e o apoio em vários experimentos.

A Frank pelos ensinamentos, muito obrigada por me ajudar nas análises.

Aos amigos do laboratório Denise, Rayssa, Bárbara, Carol, Luis, Layara, Lídia pelo apoio.

Ao professor Mauro Martins Teixeira e todo grupo Imunofar que de uma forma ou de outra participaram desse trabalho.

A Debora, Alan, Prof. Dr. Gustavo Menezes enfim ao lab N3-140 pelos ensinamentos, apoio e amizade.

A Rose, Ilma, Ilda e Hermes vocês tem grande importância nesse trabalho.

Enfim, agradeço as agências que contribuíram financeiramente para realização deste projeto: CAPES, CNPq, FAPEMIG.

Resumo

A inflamação é um processo fisiológico do organismo desencadeado por dano tecidual infeccioso ou estéril e tem o propósito crucial de restaurar a homeostase do tecido. No entanto, uma inflamação não resolvida pode levar ao dano tecidual e dar origem a doenças inflamatórias crônicas associadas à perda de função dos órgãos. Sendo assim é evidente que a resolução da inflamação é o principal processo que ocorre durante uma resposta inflamatória aguda associada ao retorno à homeostase. *Met* é um proto-oncogene envolvido na via de sinalização intracelular de crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Ele codifica o receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGFR), presente na membrana de diferentes tipos celulares é importante na proliferação, sobrevivência e migração celular. Porém, a sua participação na resolução da inflamação ainda não foi estudada. Aqui, avaliamos o papel de MET na sobrevida celular utilizando dois modelos de inflamação em camundongos. O primeiro modelo utilizado foi a pleurisia induzida por LPS. Os camundongos foram desafiados com 250 ng/cavidade de LPS. Após 6 horas do desafio com LPS, momento no qual a inflamação já está estabelecida, foi feito o tratamento com o inibidor de MET, PF-04217903. As células foram recuperadas da cavidade pleural 4 horas após o tratamento com a droga. O tratamento com PF-04217903 diminuiu o número de neutrófilos na cavidade pleural sem afetar o número de células mononucleares. Essa diminuição do número de neutrófilos foi acompanhada por um aumento do número de neutrófilos apoptóticos e eferocitose. O segundo modelo utilizado foi o de gota aguda induzida por cristais de urato monossódico (MSU). Os camundongos foram injetados com 100 µg de MSU na articulação tibiofemoral. Inicialmente, verificamos que a cinética de expressão de MET em neutrófilos está correlacionada com o acúmulo dessas células na cavidade periarticular. O tratamento com PF-04217903 foi feito 6 horas após a injeção com MSU, momento no qual a inflamação já está estabelecida. Quatro horas após o tratamento, houve uma redução do número de neutrófilos e um aumento de células apoptóticas em relação aos animais não tratados. Além disso, demonstramos que a inibição de MET foi capaz de reduzir o limiar de hipernocicepção. Avaliamos também o efeito de PF-04217903 na sobrevida de neutrófilos humanos *in vitro*. Os neutrófilos incubados com o inibidor de MET aumentou a porcentagem de células apoptóticas em relação aos neutrófilos não tratados. Assim, esses resultados demonstram que MET tem uma função muito importante na manutenção da sobrevida de neutrófilos e que a inibição da atividade desse receptor pode induzir apoptose de neutrófilos contribuindo para a resolução da resposta inflamatória aguda.

ABSTRACT

Inflammation is a salutary host reaction to infectious or sterile tissue damage and has the crucial purpose of restoring tissue homeostasis. However, an unresolved inflammation can lead to tissue damage and give rise to chronic inflammatory diseases associated to loss of organs function. Thus, it is now evident that the resolution of inflammation is the main process that occurs during an acute inflammatory response associated to return to homeostasis. *Met* is a proto-oncogene involved in the intracellular signaling pathway for cell growth, proliferation and survival. It codify the hepatocyte growth factor receptor (HGFR or Met) present on the membrane of different cell types is important in cell proliferation, survival and migration. However, its participation in the resolution of inflammation has not been studied. Here, we evaluated the role of MET in neutrophil survival using two models of inflammation in mice: the pleurisy induced by LPS and gout. Firstly, mice were challenged with 250 ng/cavity of LPS. Six hour after LPS challenge the mice was treated with the MET inhibitor, PF-04217903. Cells were recovered from the pleural cavity 4 hours after treatment with the drug. Treatment with PF-04217903 decreased the number of neutrophils in the pleural cavity without affecting the number of mononuclear cells. This decrease in the number of neutrophils was accompanied by an increase in number of apoptotic neutrophils and efferocytosis. The second model used was the acute gout induced by crystals of monosodium urate (MSU). The mice were injected with 100 µg MSU at the tibiofemoral joint. Initially, we verified that the kinetics of MET expression in neutrophils paralleled with the accumulation of these cells in the joint cavity. The treatment of mice with PF-04217903, at the peak of inflammation, also reduced the number of neutrophil associated with increased apoptotic neutrophil in articular cavity. In addition, we demonstrated that the inhibition of MET was able to reduce the threshold of hypernociception. We also evaluated the effect of PF-04217903 on survival of human neutrophils in vitro. PF-04217903 induced apoptosis in human neutrophil. Thus, these results demonstrated that MET has a important role in the maintenance of neutrophil survival and that inhibition of the activity of this receptor can induce neutrophil apoptosis, contributing to the resolution of acute inflammatory response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Papel dos neutrófilos na cascata de recrutamento de neutrófilos.....	16
Figura 2: As fases da inflamação aguda.	21
Figura 3: Estrutura do receptor MET.....	23
Figura 4: Estrutura de HGF.....	24
Figura 5: Via de sinalização HGF/MET.	25
Figura 6: HGF MET.....	26
Figura 7: Esquema ilustrando o papel de MET em neutrófilos.	29
Figura 8: Mecanismo de regulação da sinalização de MET. Erro! Indicador não definido.	
Figura 9: As estratégias terapêuticas.....	30
Figura 10: Efeito do tratamento com PF-04217903 no acúmulo de leucócitos na cavidade pleural após a injeção de LPS.	42
Figura 11: Efeito do tratamento com PF-04217903 na indução de apoptose de neutrófilos avaliada morfológicamente na cavidade pleural após a injeção de LPS.	44
Figura 12: Efeito do tratamento com PF-04217903 na apoptose de neutrófilos avaliada bioquimicamente na cavidade pleural após a injeção de LPS.....	46
Figura 13: Efeito do tratamento com PF-04217903 na apoptose de neutrófilos na cavidade pleural após a injeção de LPS.	47
Figura 14: Cinética da expressão do receptor de MET durante inflamação aguda de gota induzida por MSU.	49
Figura 15: Efeito do tratamento com PF-04217903 no acúmulo de leucócitos e indução de apoptose de neutrófilos na cavidade periarticular após a injeção de MSU.....	51
Figura 16: Efeito do tratamento com PF-04217903 na indução de apoptose de neutrófilos na cavidade periarticular após a injeção de MSU.	53
Figura 17: Efeito do tratamento com PF-04217903 na hipernocicepção, em um modelo de gota induzida por MSU.	55
Figura 18: Efeito do tratamento de PF-04217903 e zVAD-fmk em cultura de neutrófilos humanos do sangue periférico.....	57
Figura 19: Efeito do tratamento de PF-04217903 em cultura de neutrófilos humanos do sangue periférico.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

ATP: adenosina trifosfato

BSA: *bovine serum albumin*- albumina do soro bovino

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

GAGs: glicosaminoglicanos

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

HGF: Fator de Crescimento de Hepatócitos

ICAM-1: intercelular adhesion molecule-1 – molécula de adesão intercelular-1

IPT: Transcrição de Plexinas de Imunoglobulina

IL-(): interleucina-()

IFN- γ : interferon γ

i.pl.: intrapleural

LPS: lipopolissacarídeo

LXs: Lipoxinas

MAMP: *microorganisms associated molecular pattern* – padrão molecular associado a microorganismos

MET: Transição Epitelial Mesenquimal

Mres: Macrófago resolutivo

MPO: mieloperoxidase

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase*

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

NaCl: Cloreto de sódio

NaF: fluoreto de sódio

NaVO₃: vanadato de sódio

NOs: Óxido nítrico sintase

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

PECAM: *platelet endothelial cell adhesion molecule* – molécula de adesão celular endotelial-plaquetária

PI3K: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase* – fosfatidilinositol 3-cinase

PSI: Plexina, Semaforina e Integrina cisteína

PKC: *protein kinase C* – proteína cinase C

PMN: polimorfonuclear

PMSE: polimorfonuclear

RTK: Receptor de tirosina quinase

ROS: *reactive oxygen species* – espécie reativa de oxigênio

Sema: Semaforina

Ser: Serina

SDS: *sodium dodecyl sulfate* – dodecilsulfato de sódio

Tyr: Tirosina

TGF: *transforming growth factor* – fator de transformação do crescimento

Th: T helper: célula T auxiliar

TLR: *Toll like receptor* – receptor do tipo Toll

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

Tris/HCL: tampão tris hidroximetil aminometano com ácido clorídrico

UTP: uracila trifosfato

VCAM: *vascular cellular adhesion molecule-1* – molécula de adesão celular-vascular 1

Sumario:

1- INTRODUÇÃO	13
1.1-Inflamação	13
1.2-Inflamação aguda, leucócitos e seus mecanismos de recrutamento.....	13
1.3-Resolução do processo inflamatório	17
1.4-Proto-oncogene MET.....	22
1.5 MET e a resposta inflamatória.....	28
2- OBJETIVO	31
2.1- Objetivos gerais	31
2.2- Objetivos específicos:.....	31
3- MATERIAL E METÓDOS.....	32
3.1 Experimentos <i>in vivo</i>	32
3.2- Animais experimentais.....	32
3.3- Caracterização do modelo de pleurisia induzida por LPS e de gota induzida por MSU.....	32
3.4- Tratamento para inibição de MET.....	33
3.5- Processamentos das células do lavado pleural.....	33
3.6- Contagem total dos leucócitos no modelo de pleurisia aguda.....	34
3.7- Contagem total dos leucócitos no modelo de gota	34
3.8- Contagem diferencial de leucócitos.....	34
3.8.1- Caracterização morfológica de apoptose.....	35
3.8.2- Caracterização morfológica de eferocitose.....	35
3.9- Caracterização bioquímica da apoptose	35
3.9.1-Marcação extracelular	36
3.10- Caracterização da expressão de P-MET por citometria de fluxo	37
3.11- Avaliação de hipernocicepção no modelo de gota	38
3.12- Puficação de neutrófilos humanos (<i>in vitro</i>).....	38
3.13- Tratamento com PF-04217903	39
3.14- Análises estatísticas	40
4-RESULTADOS:.....	41
4.1 A inibição de MET reduz o acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural.	41

4.2 A inibição de MET promove o <i>clearance</i> de neutrófilos na cavidade pleural pela indução de apoptose seguida de eferocitose.	43
4.3 A expressão do receptor MET em neutrófilos infiltrados na cavidade articular após injeção de cristais de MSU.....	48
4.4 A inibição de MET reduz o acúmulo de neutrófilos na cavidade periarticular induzida por MSU.....	50
4.5 A inibição de MET promove a apoptose e eferocitose de neutrófilos na cavidade periarticular.....	52
4.6 Inibição de MET promove a apoptose de neutrófilos humanos in vitro.	55
5- DISCUSSÃO.....	59
6- CONCLUSÃO.....	65
7- PERSPECTIVAS.....	66
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1- INTRODUÇÃO

1.1-Inflamação

A inflamação é uma resposta à lesão tecidual que pode ser causada por diversos estímulos como infecção, trauma, isquemia, toxinas, minerais, cristais, produtos químicos e antígenos (Alessandri, AL e cols., 2013). Os eventos do processo inflamatório incluem mediadores lipídicos (como prostaglandinas e leucotrienos), citocinas, quimiocinas, aumento na permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos e aumento da capacidade sobrevivência de granulócitos no tecido lesionado. A presença desses eventos durante a inflamação promove os sinais cardinais da inflamação descritos por Cornelius Celsus no primeiro século, que são o rubor (vermelhidão), calor, tumor (inchaço) e dor. Além desses sinais, em 1858 foi incluída a perda de função do tecido descrito por Rudolph Virchow (Basil,MC e Levy, DB, 2015; Medzhitov, R 2010).

Contudo, quando a resposta inflamatória não é controlada (não resolvida), ela pode levar a um dano tecidual excessivo e duradouro causado, principalmente, pelo acúmulo de leucócitos e liberação de seus produtos citoplasmáticos (Lawrence,T e Gilroy, TW 2007). Assim, a resposta inflamatória está envolvida na patogênese de várias doenças crônicas humanas, tais como aterosclerose, asma, doenças auto-imune e várias doenças neuropatológicas, como doença de Alzheimer e doenças de Parkinson (Bannenberg, GL e cols., 2005).

1.2-Inflamação aguda, leucócitos e seus mecanismos de recrutamento

A resposta inflamatória pode ser dividida em aguda (auto-limitada) e crônica (persistente). A inflamação é um evento fisiológico complexo que é coordenado pela produção de mediadores moleculares e por ativação de células. Inicia-se com a produção de mediadores solúveis (incluindo proteínas do complemento, quimiocinas, citocinas, radicais livres, vasoativos, aminas e eicosanóides (tais como prostaglandinas) por células residentes como

macrófagos teciduais, células dendríticas (DCs), células endoteliais, fibroblastos e mastócitos no tecido lesado ou infectado, ativando os leucócitos circulantes e as células endoteliais (Fullerton, JN e Gilroy, DW, 2016). A liberação desses mediadores solúveis por células residentes promove vasodilatação arteriolar que leva aumento do fluxo sanguíneo do vaso próximo a área danificada, resultando em hiperemia local e aumento da permeabilidade vascular. Nesta fase inicial, as alterações no endotélio vascular são detectáveis com consequente exsudação de proteínas plasmáticas do sangue para dentro do tecido (Alessandri, AL e cols., 2013).

Os neutrófilos se originam e amadurecem na medula óssea e são posteriormente liberados para a vasculatura periférica. Nos seres humanos, cerca de 100 bilhões de neutrófilos entram e deixam sangue circulante todos os dias e constituem a população leucocitária dominante na circulação. Eles medeiam às primeiras respostas imunes inatas na inflamação e desempenham um papel fundamental na resolução da inflamação (Teng, TS e cols., 2017). Os neutrófilos sobrevivem por um período máximo de 24-36 horas no sítio inflamatório (Vago, JP e cols., 2016). A migração dos neutrófilos para o local da inflamação envolve seguintes eventos:

01) Liberação de histamina e citocinas como TNF e IL-1 β liberados por células residentes, que ativam células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, como E e P selectinas, as quais se ligam a glicoproteínas presentes nos neutrófilos. Essa etapa facilita a ligação inicial do neutrófilo ao endotélio, permitindo o **rolamento** de neutrófilos nas vênulas periféricas (Sanz, MJ e Kubes, P, 2012; Teng, TS e cols., 2017).

02) Os neutrófilos rolantes reconhecem quimiocinas como CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 e CXCL8 (variando de espécie para espécie), as quais estão concentradas em glicosaminoglicanos (GAGs) e DARC presentes na membrana das células endoteliais. Essa etapa promove a **ativação e a adesão leucocitária (Figura1;** Sanz e Kubes, 2012; Teng, TS e cols., 2017).

3) Posteriormente, ocorre ativação de integrinas β 2 presentes na superfície de neutrófilos. Promovendo uma mudança conformacional de uma conformação inativa para uma conformação completamente expandida e com alta afinidade de ligação a molécula de adesão-1 (ICAM-1) e molécula de

adesão celular (VCAM-1), que estão presentes no endotélio do vaso, resultando em uma adesão firme (Teng, TS e cols., 2017).

4) As integrinas também induzem o rastejamento e estendimento do pseudópodes na superfície endotelial. Os leucócitos aderentes rastejam ativamente no lúmen dos vasos inflamados em busca de locais para migração transendotelial (Sanz, MJ e Kubes, P, 2012; Teng, TS e cols., 2017).

No sítio inflamatório, os neutrófilos reconhecem MAMPs (padrões moleculares associados a microrganismos) ou DAMPs (padrões moleculares associados ao dano tecidual), através dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares, como aqueles do tipo Toll (TLR). Podendo ocorrer também a opsonização dos microrganismos por componentes de complemento e imunoglobulinas (Igs), que são reconhecidos por receptores específicos presentes nos neutrófilos. A ativação desses receptores desencadeia uma cascata de sinalização intracelular e ativação de genes pró-inflamatórios (Prince, LR e cols., 2011). No local da inflamação os neutrófilos promovem ações microbicidas e fagocitárias. Para isso, utilizam uma combinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas de NADPH oxidase, mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico sintetase (NOs) (Teng, TS e cols., 2017; Warren, E e cols., 2017).

Os neutrófilos apresentam vários tipos de grânulos que se fundem com vacúolos fagocíticos para facilitar a eliminação do agente causador da inflamação. Os estímulos são reconhecidos por neutrófilos sendo então transportados e fundidos os grânulos em um processo chamado degranulação, levando à morte de agentes patogênicos em um processo que envolve a liberação e ação de proteinases e peptidases (Teng, TS e cols., 2017; Warren, E e cols., 2017).

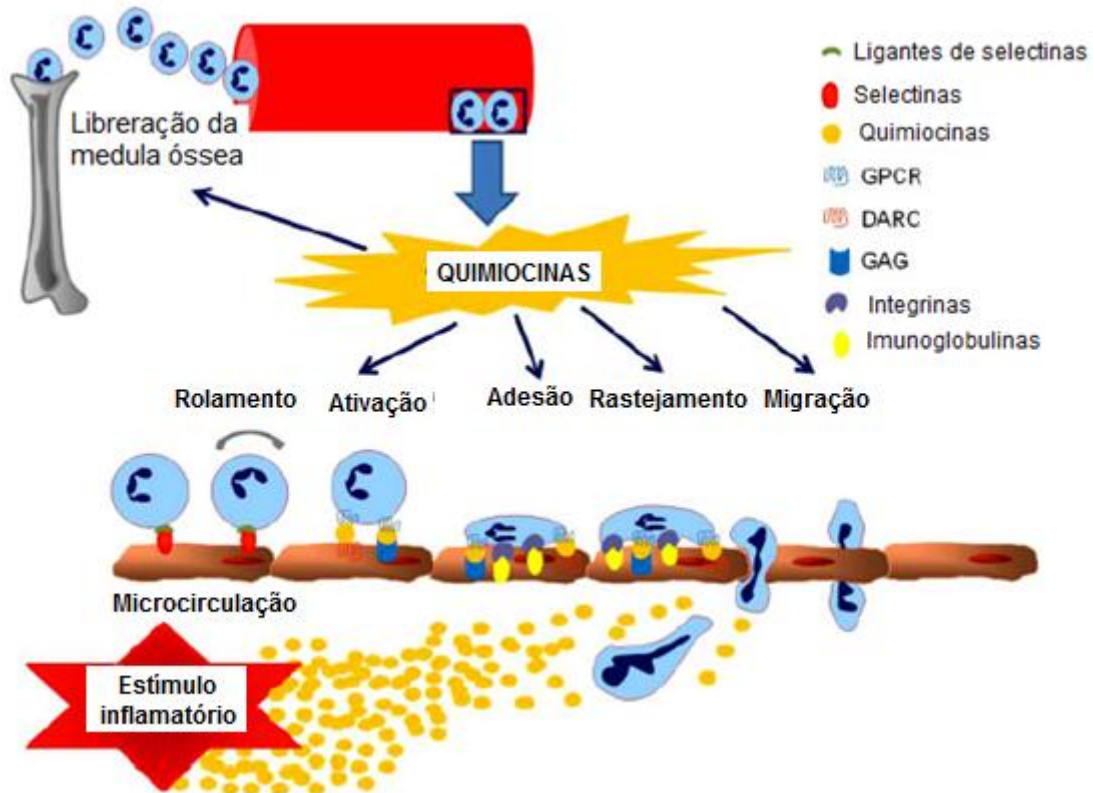


Figura 1: Papel dos neutrófilos na cascata de recrutamento de neutrófilos. A mobilização de neutrófilos da medula óssea durante a inflamação requer a interação entre quimiocinas e seus receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Na microvasculatura, a ativação das células endoteliais resulta na expressão de selectinas que facilitam a ligação inicial e o rolamento de neutrófilos. Os neutrófilos rolantes podem detectar quimiocinas imobilizadas por glicosaminoglicanos (GAGs) ou por receptores de membrana como o DARC, através de GPCR. A ativação de neutrófilos através da ligação de quimioquinas com os receptores de neutrófilos geram sinais que ativam integrinas, levando a uma firme adesão. Então, os neutrófilos rastejam em busca de locais ideais para migração, guiados por gradientes de quimiocinas e deixam a microvasculatura migrando entre células endoteliais (via paracelular) ou diretamente através de células endoteliais (via transcelular). (Adaptado de Sanz, MJ e Kubes, P, 2012).

Juntamente com a chegada dos neutrófilos e dependendo do tipo de resposta inflamatória, outros leucócitos migram para o tecido inflamado, dentre eles podemos destacar os eosinófilos e os basófilos (Serhan, CN e cols., 2007). Embora os neutrófilos sejam essenciais para a eliminação adequada do patógeno, o influxo exagerado de leucócitos e a permanência dessas células no local inflamado podem ser mais prejudicial do que a infecção ou lesão em si. Inclusive a permanência e influxo exagerado dessas células são responsáveis pela dor inflamatória, uma vez que citocinas liberadas por neutrófilos e ROS

ativam e sensibilizam neurônios nociceptivos (Ruiz-Miyazawa, KW e cols., 2015). Portanto, há uma necessidade de regular a presença dessas células no local inflamatório, pois a desregulação pode promover uma inflamação persistente, a qual pode estar associada a uma perda da resposta de resolução e a incapacidade de solucionar adequadamente a inflamação aguda (Fullerton e cols., 2016).

1.3-Resolução do processo inflamatório

A permanência e a ativação das células recrutadas para o tecido inflamado necessitam de um controle refinado. Esse controle ocorre por mecanismos associados aos eventos de resolução da resposta inflamatória (Alessandri, AL e cols., 2013). A resolução da resposta inflamatória é um processo ativo que ocorre entre o grande influxo de células inflamatórias e o retorno a homeostase, envolvendo a completa remoção de células efetoras e produção de mediadores pró-resolutivos (Alessandri, AL e cols., 2013). As etapas e eventos que levam à resolução da resposta inflamatória são **(Figura 2)**:

1) Diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios. Os leucócitos presentes no tecido podem liberar fatores que estimulam a inflamação como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e mediadores lipídicos. Os mediadores lipídicos ocorrem em resposta à invasão de patógenos ou lesões teciduais. Ácidos graxos poli-insaturados são liberados localmente a partir de fosfolípidos de membrana (como o ácido araquidônico) e convertidos em eicosanoides (isto é, prostaglandinas e leucotrienos), os quais ajudam a direcionar os neutrófilos do sangue periférico para os locais estímulos. A prostaglandina regula o fluxo sanguíneo, enquanto o leucotrieno regula a permeabilidade vascular. Os leucotrienos assim como as citocinas, e quimiocinas, auxilia a migração de neutrófilos para o local do estímulo inflamatório. Os neutrófilos também produzem mediadores pró-inflamatórios, mas à medida que a inflamação prossegue, eles deixam de produzir esses mediadores, promovendo uma diminuição do recrutamento de granulócitos,

vasodilatação e permeabilidade vascular (Alessandri, AL e cols., 2013; Basil, MC e Levy, DB, 2015; Serhan, CN e cols., 2008).

2) Substituição de mediadores pró-inflamatórios por pró-resolutivos. Em seguida, a prostaglandina induz gradualmente por meio de enzimas chave na produção de mediadores que têm tanto atividades anti-inflamatórias como de resolução, tais como as lipoxinas, resolvinas e protectinas. As quais promovem a desativação de vias de sinalização associadas com produção de citocinas e sobrevivência de leucócitos (Alessandri, AL e cols., 2013; Basil, MC e Levy, DB, 2015; Serhan, CN e cols., 2008; Francischetti, I e cols., 2010).

3) Apoptose de células inflamatórias recrutadas. A apoptose é um processo em que a membrana plasmática celular permanece íntegra enquanto as organelas se agrupam e a célula diminui de tamanho. A cromatina se prende à carioteca e ocorre fragmentação do núcleo, enquanto se formam bolhas de citoplasma revestidas por membrana plasmática. Essas bolhas se desprendem e formam corpos apoptóticos, que são então reconhecidos e fagocitados sem que haja perda de integridade das membranas celulares, extravasamento de enzimas. Os granulócitos no tecido sofrem apoptose e secretam lipoxinas (LXs), lactoferrina e anexina A1, que inibem o recrutamento de granulócitos durante a resolução para restaurar a homeostase do tecido inflamado. A apoptose também previne a lesão tecidual visto que não ocorre a liberação de conteúdo celular potencialmente tóxico para local da inflamação, promovendo então uma “morte silenciosa”, não flogística (Alessandri, AL e cols., 2013; Serhan, CN e cols., 2008).

4) Depuração de células apoptóticas por fagócitos (especialmente por macrófagos no processo não-flogístico). As células apoptóticas sinalizam a necessidade de serem removidas liberando sinais de “*eat-me*” (fagocite-me), que são marcadores de superfície celular reconhecidos por fagócitos. Um exemplo desses marcadores é a externalização da fosfatidilserina (PS) na membrana de células apoptóticas. A interação entre sinais presentes em células apoptóticas com receptores de macrófagos garante que as células apoptóticas sejam removidas eficientemente do tecido antes da ruptura da

membrana, minimizando o dano tecidual e a permanência da inflamação. A fagocitose de células apoptóticas é chamada de eferocitose. As células apoptóticas também liberam sinais de “*find-me*” (encontra-me) através da liberação de sinais lipídicos como lisofosfatidilcolina, esfingosina-1-fosfato (S1P), nucleotídeos ATP e UTP e as quimiocinas clássicas CX3CL1 E CCL2 (Alessandri, AL e cols., 2013; Basil e Levy, 2015; Serhan, CN e cols., 2008; Francischetti e cols., 2010).

Os macrófagos são células imunes mononucleares derivadas de monócitos. Os monócitos estão presentes na corrente sanguínea, onde circulam por vários dias até migrarem para diferentes tecidos ou órgãos e restaurarem as populações de macrófagos após uma inflamação. Diferentes subespecialidades de macrófagos existem em vários órgãos em todo o corpo. Eles desempenham um papel fundamental tanto na imunidade inata como na imunidade adaptativa, promovendo a secreção de mediadores da inflamação, fagocitose de microrganismos invasores e de células apoptóticas do hospedeiro. Em resposta a vários sinais de origem exógena e endógena, os macrófagos polarizam ou passam pela ativação e adquirem propriedades funcionais diferentes, desenvolvendo-se em diferentes fenótipos (Gordam e Tylor 2005; Muimo R., 2017). Por exemplo, macrófagos M1, também conhecidos como *classicamente ativados*, são considerados pró-inflamatórios devido à grande capacidade de liberar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esse fenótipo é ativado por células Th1, as quais promovem a liberação interferon gama (IFN- γ) e pelo reconhecimento de padrões de moléculas associadas a patógenos que estimulam o fenótipo M1. Já o fenótipo M2, chamado de *alternativamente ativados*, são estimulados pelas células Th2 através da liberação IL-4. Os macrófagos M2, então, produzem IL-10 e TGF- β , que têm ações anti-inflamatórias. Posteriormente, os macrófagos se convertem para um perfil de macrófagos resolutivos (Mres), os quais limitam a reparação por fibrose no tecido inflamado e migram através dos locais de drenagem para os gânglios linfáticos locais, promovendo propriedades reguladoras de macrófagos (Alessandri, AL e cols., 2013). Os Mres são essenciais para modulação de respostas imunes e resolução da inflamação. É importante

salientar que a eferocitose provoca a mudança de fenótipo de macrófagos pró-inflamatórios, inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-12, IL-1 β e IL-18 e passa a liberar citocinas anti-inflamatórias/pro-resolutivas, como IL-10 e TGF- β , sendo um caminho para resolução da inflamação (Alessandri, AL e cols., 2013; Basil e Levy, 2015; Serhan, CN e cols., 2008).

Sendo o processo de resolução da resposta inflamatória um mecanismo importante para impedir a inflamação persistente, a fibrose e inflamações crônicas (Serhan, CN e cols., 2007; Alessandri, AL e cols. 2013).

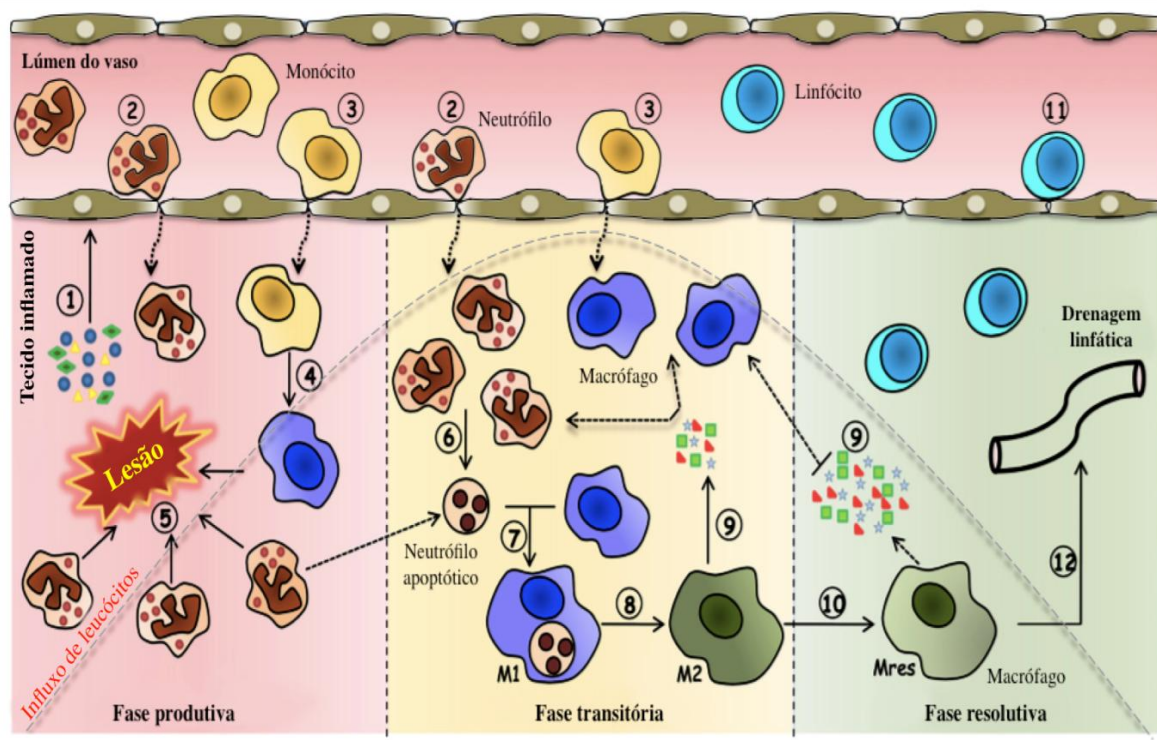


Figura 2: As fases da inflamação aguda. A presença de um estímulo nocivo desencadeia a síntese de mediadores pró-inflamatórios (1) com consequente formação de um edema, apresentando o extravasamento de fluidos a partir de um endotélio mais permeável e a migração de neutrófilos (2), seguidos de células mononucleares (3) para o tecido lesado. No sítio inflamatório, monócitos recrutados se diferenciam em macrófagos (4) que, juntamente com os neutrófilos, produzem mediadores como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e ROS (5), que auxiliam em suas funções efetoras. Na fase transitória, há uma redução de mediadores inflamatórios e um aumento da liberação de mediadores pró-resolutivos, ocasionando a apoptose de PMNs (6), seguida de sua eferocitose por macrófagos teciduais (7). Durante a eferocitose, macrófagos mudam o fenótipo M1 para M2 (8), liberando mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos (9), que inibem o influxo de neutrófilos, intensificam a migração de monócitos e amplificam a eferocitose. Durante a fase resolutive, macrófagos M2 mudam o fenótipo novamente, para Mres (resolutivo) (10), que produz mediadores antifibróticos, antioxidantes, anti-inflamatórios e pró-resolutivos. A liberação desses mediadores limita a lesão tecidual e fibrose, induz a repopulação de linfócitos (11) e induz a remoção de Mres por meio da circulação linfática (12), restaurando a homeostase do tecido (Adaptado de Alessandri, AL e cols, 2013).

Assim, os mecanismos celulares pelos quais a resolução ocorre e os caminhos bioquímicos associadas com o retorno à homeostase abrem novos caminhos para possíveis intervenções terapêuticas em uma ampla gama de doenças associadas com a inflamação. No entanto, o objetivo é obter uma terapia que estimule e antecipe o processo de resolução, não promovendo

efeitos indesejáveis, diferente das terapias anti-inflamatórias as quais podem promover efeitos adversos e imunossupressão (Alessandri, AL e cols., 2013; Perretti, M e cols., 2015).

1.4-Proto-oncogene MET

Os proto-oncogenes são genes que estão envolvidos em uma série de estágios da sinalização do crescimento celular, na transdução dos sinais da membrana plasmática para o núcleo e na integração dos sinais de crescimento e no redirecionamento da biossíntese de macromoléculas incluindo o DNA (Videira, SR e cols., 2002). Eles desempenham funções críticas e a mínima alteração dessas moléculas causam graves transtornos nos processos de divisão celular. Uma célula saudável contém proto-oncogenes, cujas mutações somáticas podem resultar em uma expressão do gene em tempo inapropriado, em excesso ou de forma anormal. É um gene que quando transformado, por exemplo, por compostos químicos ou por vírus, origina um oncogene (Manso, C, 1986). Esses genes possuem uma alta fidelidade de conservação da sua mensagem genética ao longo da evolução dos vertebrados, incluindo alguns invertebrados. Alguns são ativos apenas no desenvolvimento embrionário, e tornam-se quiescentes mais tarde (Manso, C, 1986).

O proto-oncogene *met* encontra-se no cromossomo 7q21-31 e codifica o receptor de Transição Epitelial Mesenquimal (MET). Este receptor é um receptor tirosina quinase (RTK), que pertencem à família de receptores de superfície celular de elevada afinidade para fatores de crescimento, citocinas e hormônios (Birchmeier, C e cols., 2003). Os RTKs regulam muitas vias de transdução de sinal intracelular envolvidas em múltiplos processos biológicos normais e patológicos como sobrevivência celular, migração celular, metástase e resistência a tumores. O receptor MET é um heterodímero de glicoproteína de 190 kDa constituído por uma subunidade α extracelular ligada à subunidade β transmembranar por uma ligação dissulfeto (Garajová, I e cols., 2015). A porção extracelular inclui o domínio semaforina (Sema), o domínio PSI (Plexina, Semaforina e Integrina) e quatro domínios IPT (Transcrição de Plexinas de Imunoglobulina) (Garajová, I e cols., 2015). O domínio intracelular

inclui uma sequência de justamembrana, uma região catalítica e um local de acoplamento multifuncional carboxi-terminal (Garajová, I e cols., 2015). O domínio justamembrana contém resíduos de serina 975 e tirosina 1003, que estão envolvidos na regulação de MET (Garajová, I e cols., 2015). Uma região catalítica modula positivamente a atividade quinase e por fim, um local de acoplamento multifuncional carboxi-terminal é responsável pelo recrutamento de muitos transdutores e adaptadores intracelulares (**Figura 3**, Garajová, I e cols., 2015).

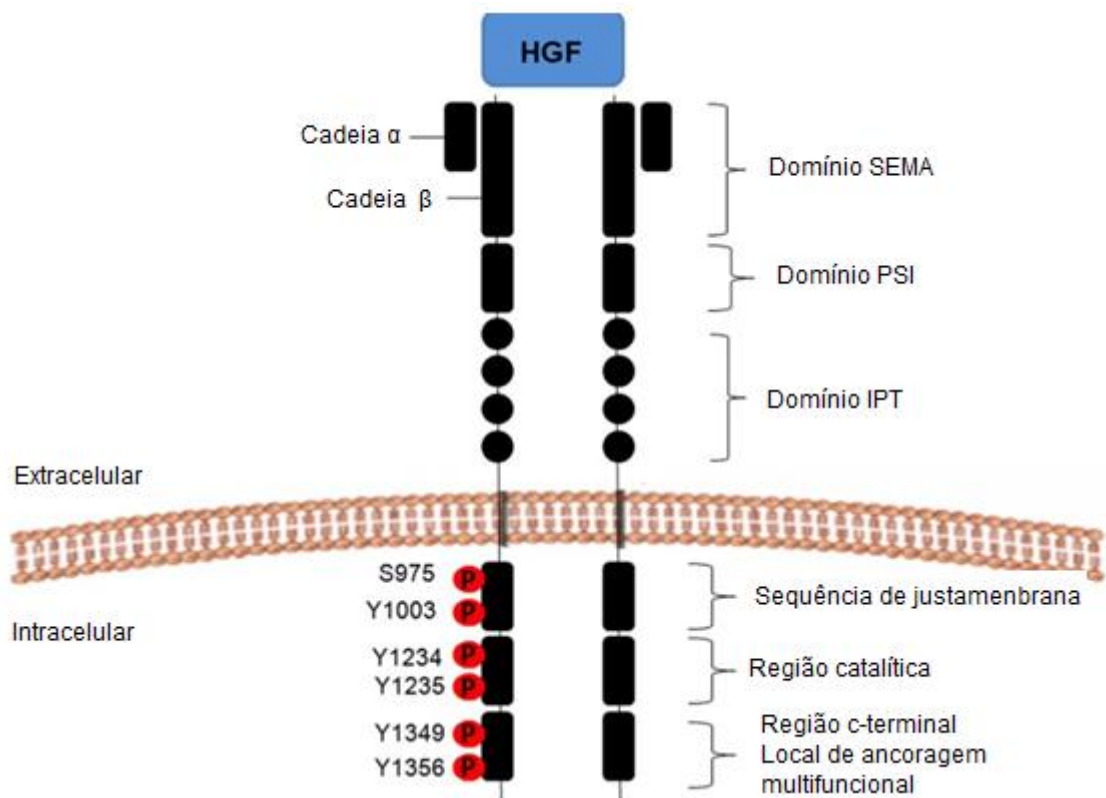


Figura 3: Estrutura do receptor MET. A porção extracelular inclui o domínio SEMA, domínio PSI e domínio IPT. A porção intracelular inclui a sequência de justamembrana, domínio catalítico e região c-terminal que é o local de acoplamento multifuncional do receptor (Adaptado de Garajová, I e cols., 2015).

O receptor MET é expresso por células de origem epitelial, células-tronco e em células progenitoras. No embrião, MET possui a capacidade de gerar novos tecidos e, no adulto, pode promover a regeneração de tecidos danificados. O Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) é o único ligante descrito até o momento para MET e é restrito a células de origem

mesenquimais (Birchmeier, C e cols, 2003). Sua forma biologicamente ativa consiste em um heterodímero de ligação dissulfeto contendo uma cadeia α e uma cadeia β . A cadeia α contém um domínio de laço em forma de gancho (HP) amino-terminal, seguido por quatro domínios conhecidos como domínios *kringle* (Garajová, I e cols., 2015). O último contém um domínio de homologia de proteases de serina (SPH) que não possui atividade proteolítica (**Figura 4**). O MET tem dois locais de ligação para o HGF, os domínios IPT3 e IPT4 que se ligam ao domínio N terminal de HGF com elevada afinidade. O domínio SEMA irá ligar o domínio SPH de HGF com baixa afinidade (Garajová, I e cols., 2015).

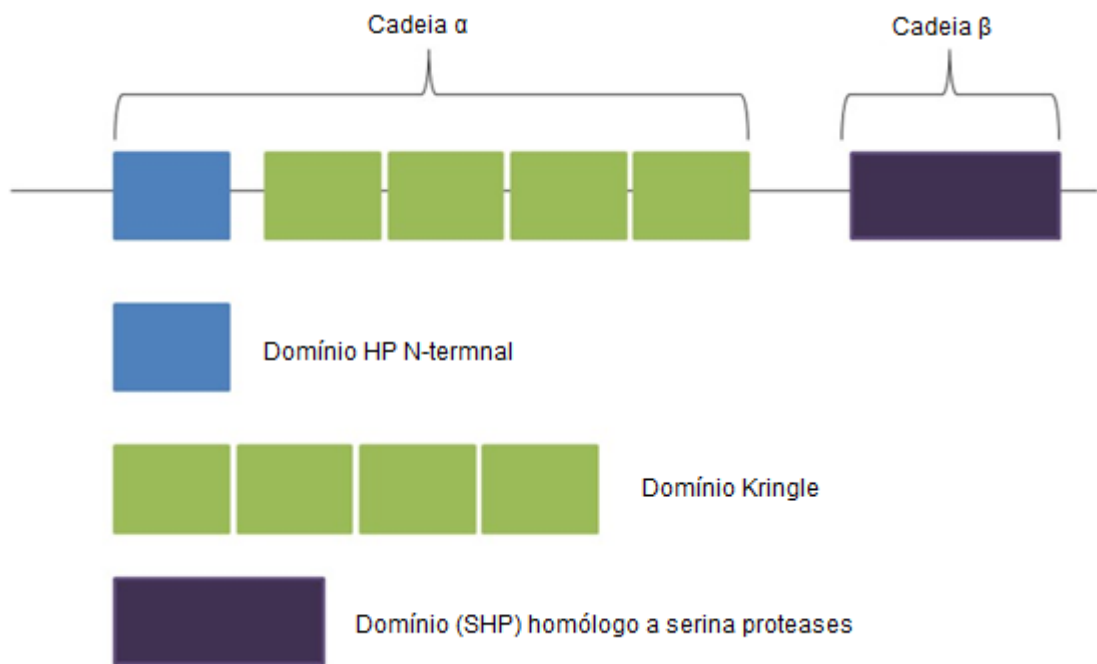


Figura 4: Estrutura de HGF. A sua forma biologicamente ativa consiste num heterodímero de ligação disulfeto contendo uma cadeia α e uma cadeia β . (Adaptado de Garajová, I e cols., 2015).

HGF é liberado por células mesenquimais como uma cadeia simples, biologicamente inativa, e convertida na sua forma madura por um processo de clivagem catalisado por proteases extracelulares (Birchmeier, C e cols., 2003). Para ativar o receptor MET, o precursor de HGF de cadeia simples é clivado em um heterodímero ativo, por uma protease denominada ativadora de HGF (HGFA). Este processo é regulado por uma família de proteínas de inibidores de serina protease chamados SPINT1 e SPINT2 (**Figura 5**; Faria, C e cols., 2011).

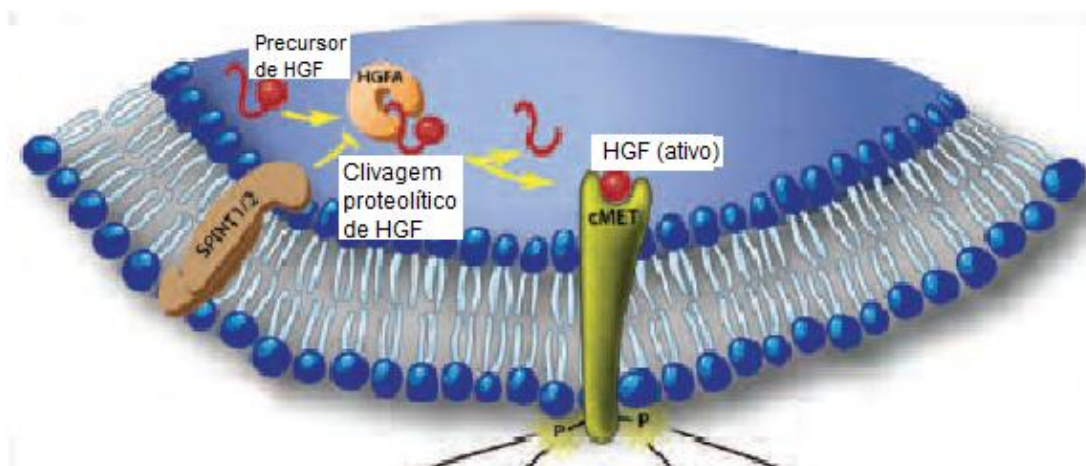


Figura 5: Via de sinalização HGF/MET. Após a clivagem proteolítica de HGF ele se torna ativo para se ligar ao sítio do receptor MET, que ao ser ativado promove a sinalização de várias vias (Adaptado de Faria, C e cols., 2011).

Quando HGF se liga ao receptor MET presente na membrana plasmática, ocorre à dimerização estável de MET e subsequente ativação do seu domínio intracelular através de um processo de trans-fosforilação dos dois resíduos de tirosina nas regiões catalíticas Y1234 e Y1235, seguido por trans-fosforilação de duas tirosinas de ancoragem (Y1349 e Y1356) no local carboxi-terminal (Garajová, I e cols., 2015). Estas duas tirosinas formam o local de acoplamento multifuncional que é exclusivo para membros da subfamília MET e essencial para sua sinalização. Posteriormente MET se liga a múltiplos substratos e ativa uma variedade de vias de sinalização, quer através da interação direta com moléculas de sinalização, quer através de adaptadores (**Figura 6**). MET pode ativar vias de sinalização intracelular como MAPK, cascatas PI3K-AKT, vias de sinalização STAT e NF- κ B, promovendo a proliferação, sobrevivência, migração e invasividade de células que expressam o receptor MET (Garajová, I e cols., 2015). O fator nuclear kappa B (NF- κ B), fosfoinositide-3-quinase (PI3K) e adenosina monofosfato cíclico são as principais moléculas e caminhos envolvidos na sobrevivência e manutenção dos leucócitos no local inflamatório (Alessandri, AL e cols.,2013; Garajová, I e cols., 2015).

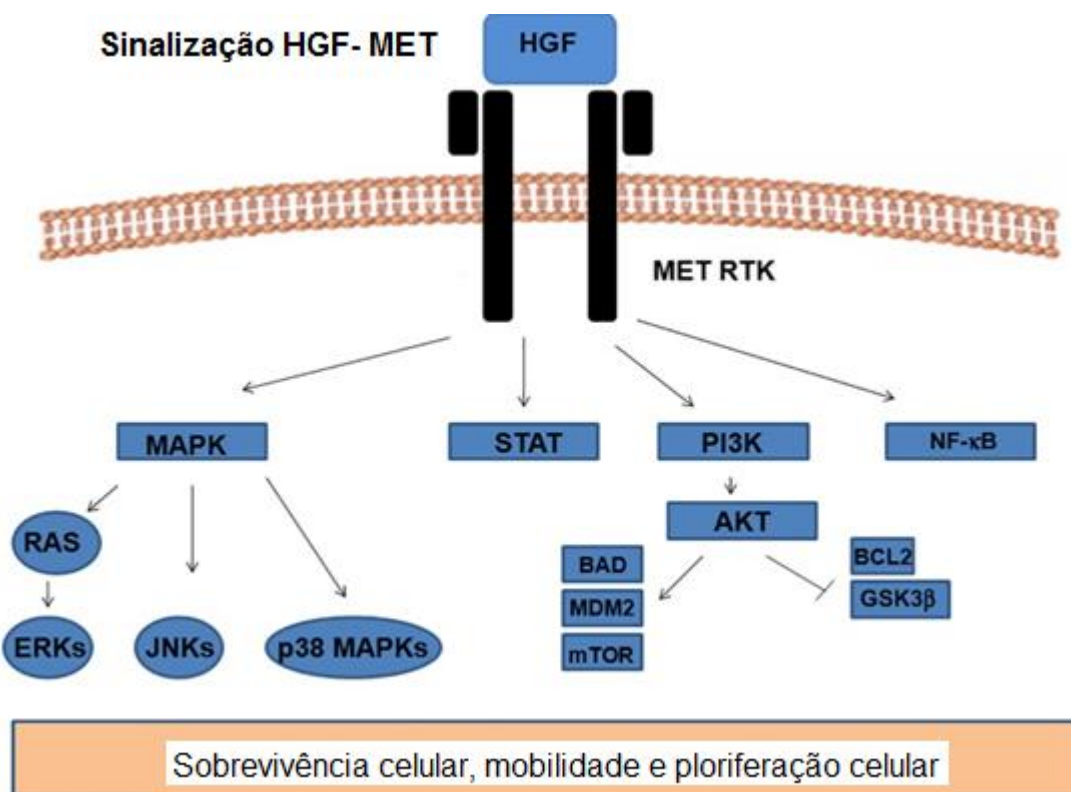


Figura 6: HGF MET. Representação dos componentes efetores HGF-MET (cascatas MAPK, STAT, PI3K-AKT e NF-κB) promove aumento na sobrevivência, mobilidade e proliferação celular (Adaptado de Garajová, I e cols., 2015).

A ativação do receptor MET pode ser regulada após a sua internalização por endocitose mediada por clatrina. Após endocitose pode originar uma regulação positiva como a ativação de ERK que promove adesão e migração celular ou ativação de STAT que promove a proliferação celular. Porém MET pode ter também uma regulação negativa se acumulando em corpos multivesiculares, que depois se fundem com os lisossomos e ocorre a degradação do receptor ativado (**Figura 7**). MET também pode sofrer clivagem proteolítica sequencial em dois locais justamembranais. A primeira clivagem ocorre no domínio extracelular e é mediada por uma desintegrina e metaloprotease (ADAM) interferindo na atividade do receptor. A segunda clivagem é realizada na região intracelular, Por uma γ -secretase e produz um fragmento que é destruído no proteassoma (Finisguerra, V e cols.,2011).

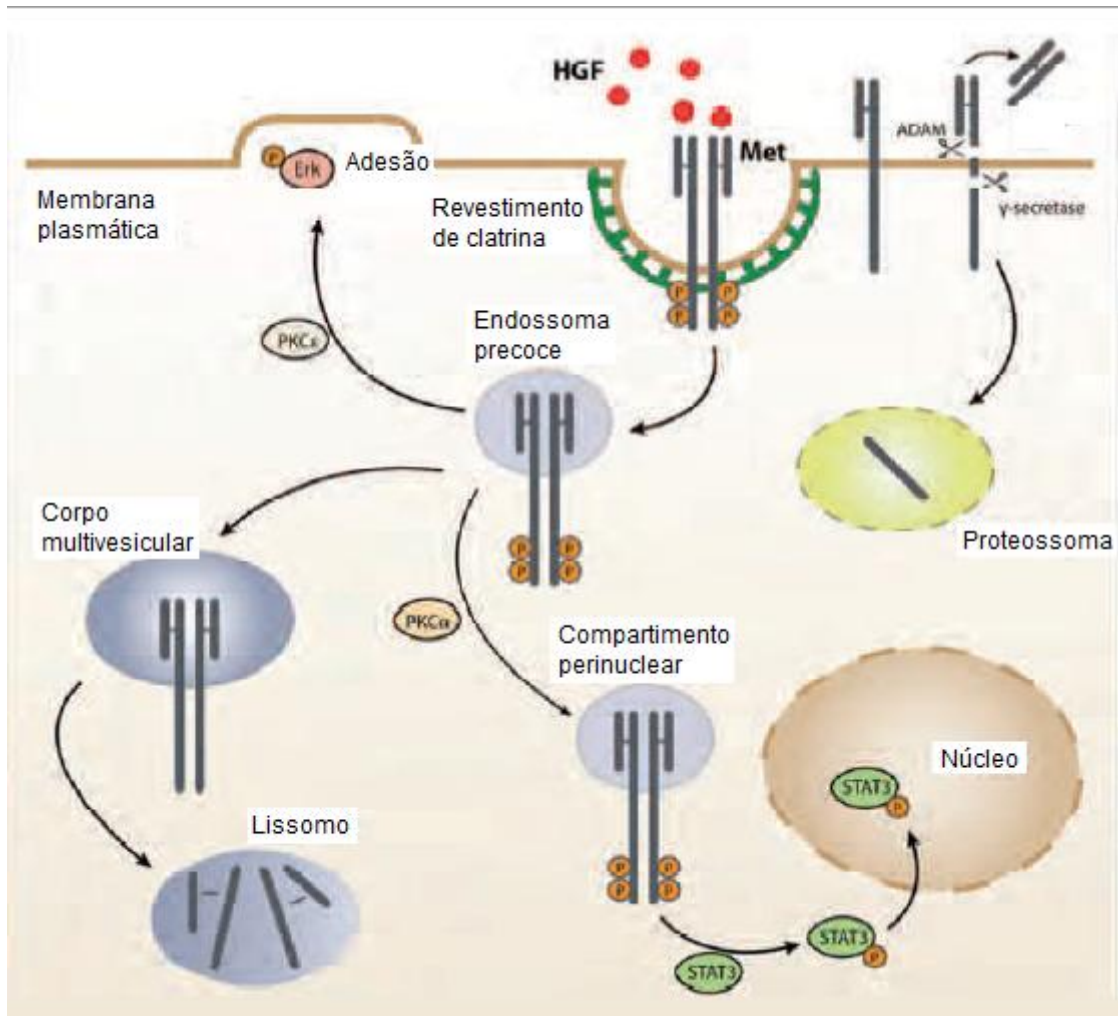


Figura 7: Mecanismo de regulação da sinalização de MET. A ativação do receptor MET pode originar uma regulação negativa ou positiva da sinalização. Através da formação de vesículas lisossomais, compartimento perinuclear, proteossoma e as enzimas ADAM, γ -secretase (Adaptado de Faria, C e cols., 2011).

1.5 MET e a resposta inflamatória

A expressão de MET e o aumento da expressão de HGF são observados em vários tecidos ou órgãos lesados como no fígado, rim e coração (Birchmeier, C e cols., 2003). Estímulos inflamatórios induzem a expressão do receptor MET na membrana de neutrófilos e contribui para o extravasamento de neutrófilos nos tecidos inflamados (Finisguerra, V e cols., 2015). Neutrófilos extravasados respondem ao HGF, produzindo óxido nítrico citotóxico, o qual pode desempenhar um papel importante na eliminação de agentes causadores da inflamação, porém, MET também é vital para a sobrevivência das células inflamatórias no local da inflamação (Finisguerra, V e cols., 2015). Em tumores ou infecções, a liberação de citocinas, tais como IL-1, no local inflamatório irá promover a expressão de TNF no endotélio e no tecido circundante. Quando neutrófilos circulantes encontram o endotélio ativado, o TNF liberado pelas células endoteliais irá se ligar ao seu receptor (TNFR1) e desencadear a ativação NF- κ B, que, por sua vez, irá induzir a expressão de MET na superfície neutrófilos (**Figura 8**). HGF é liberado proteoliticamente no local da inflamação e irá ligar-se a MET e estimular a adesão firme dos neutrófilos ao endotélio, pelo acoplamento de integrina, e, assim, promover a diapedese de neutrófilos para o sítio inflamatório. Uma vez extravasada, a via HGF/MET ainda funcionará nos neutrófilos reforçando a sua resposta citotóxica através da indução de iNOS e a produção de NO (óxido nítrico; Finisguerra, V e cols., 2015).

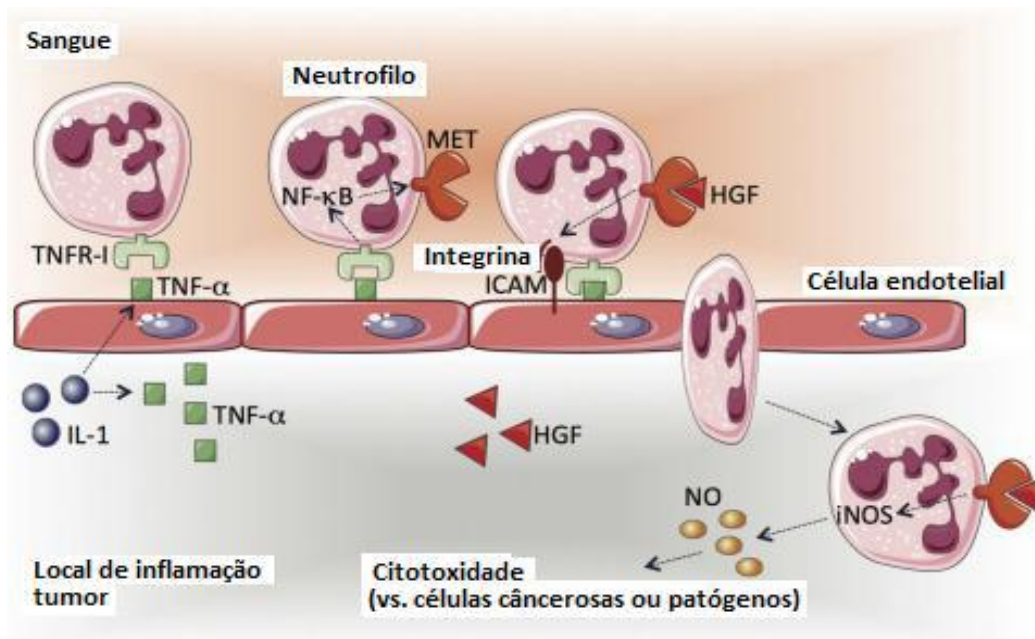


Figura 8: Esquema ilustrando o papel de MET em neutrófilos. Liberação de citocinas promovem a expressão de TNF no endotélio ou tecido tumoral. Quando neutrófilos circulantes encontram o endotélio ativado, o TNF liberado pelas células endoteliais se ligam ao seu receptor e desencadeiam a ativação NF-κB, que, por sua vez, irá induzir a expressão de MET na superfície neutrófilos. HGF é liberado proteoliticamente no local da inflamação e irá ligar-se a MET e estimular a adesão firme dos neutrófilos ao endotélio. Neutrófilos extravasados respondem ao HGF, produzindo óxido nítrico citotóxico (Adaptado de Finisguerra, V e cols, 2015).

1.6- Inibição de MET

A ativação da via HGF/MET pode ser inibida de diferentes formas. Os agentes que têm como alvo o HGF podem ser divididos em inibidores de ativação de HGF (impedindo a clivagem de pró-HGF na forma ativa) ou inibidores de HGF (bloqueando a ligação direta de HGF ao receptor MET) (Garajová, I e cols., 2015). Já os agentes que têm como alvo o receptor MET podem ser conhecidos como antagonistas de MET (que se ligam ao receptor) ou como inibidores da tirosina-quinase MET (TKIs), inibindo a ativação das vias intracelularmente (Garajová, I e cols., 2015).

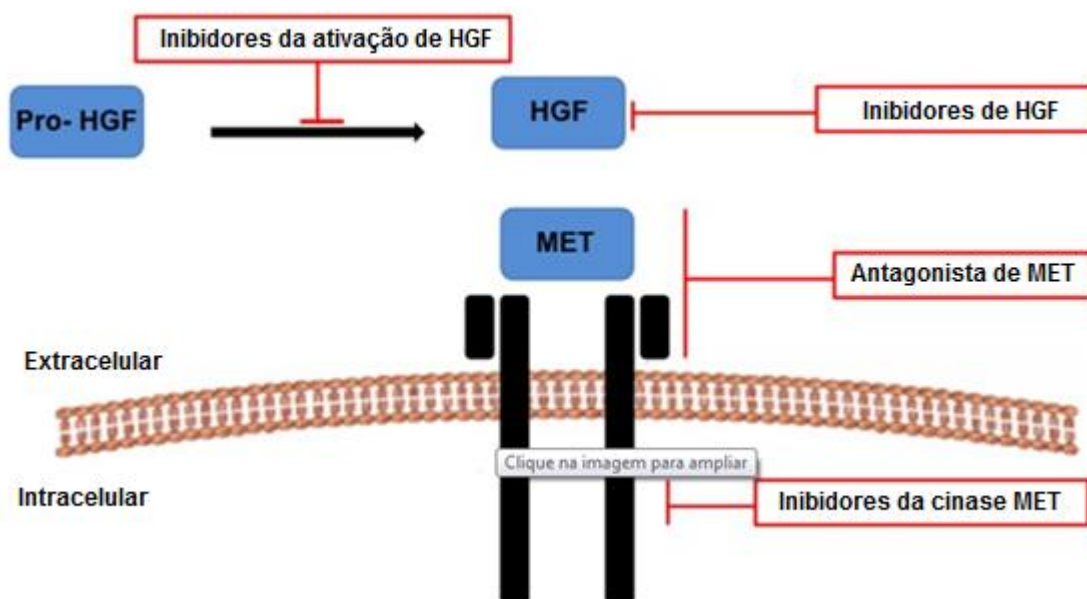


Figura 7: As estratégias terapêuticas. As vias de sinalização de HGF-MET incluem inibidores de ativação de HGF, inibidores de HGF, antagonistas MET e inibidores da quinase MET (Adaptado de Garajová, I e cols., 2015).

No presente trabalho, foi utilizada a droga PF-04217903, 2-[4-(3-quinolin-6-ilmetil-3H-[1,2,3] triazolo [4,5-b] pirazin-5-il)-pirazol-1-il]-etanol que é um inibidor da atividade tirosina-quinase de MET por meio de competição com ATP pelo sítio catalítico da proteína (Yamazaki, S e cols., 2011). PF-04217903 mostrou seletividade para MET superior a 1000 vezes comparado com outras quinases (Zou, H e cols., 2012; Yamazaki, S e cols., 2011).

Embora estudos tenham demonstrado o papel de MET na resposta inflamatória, não foi avaliado se a ativação de MET está relacionada com eventos da resolução da resposta inflamatória.

2- OBJETIVO

2.1- Objetivos gerais

Avaliar o papel da inibição de MET na resolução da resposta inflamatória envolvida na pleurisia induzida por LPS e da gota aguda induzida por cristais de MSU em camundongos.

2.2- Objetivos específicos:

1. Avaliar a proteína MET durante as diferentes fases da resposta inflamatória (início, pico e resolução);

2. Analisar os efeitos da inibição de MET no acúmulo de neutrófilos;

3. Analisar os efeitos da inibição de MET na indução de apoptose de neutrófilos;

4- Avaliar se a inibição de MET interfere na eferocitose de neutrófilos apoptóticos;

5. Avaliar o efeito da inibição de MET na hipernocicepção no modelo murino de gota.

6. Avaliar se a inibição de MET promove a apoptose de neutrófilos humanos.

3- MATERIAL E METÓDOS

3.1 Experimentos *in vivo*

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo de pesquisa 235/2016.

3.2- Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, de 8 a 12 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram acondicionados em grupos de, no máximo, cinco camundongos por gaiola pequena (Dimensões: comprimento 30cm, largura 16cm e altura 12cm) de com livre acesso à ração, água, e em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h/12h).

3.3- Caracterização do modelo de pleurisia induzida por LPS e de gota induzida por MSU

No modelo de pleurisia aguda, camundongos receberam uma dose de LPS intrapleural que promoveu uma inflamação na microvasculatura subpleural. O processo inflamatório induzido experimentalmente foi iniciado com a liberação de mediadores químicos por células residentes e posteriormente exsudação e o influxo de células inflamatórias para o local, sendo então o modelo de pleurisia por LPS utilizado como um modelo de resposta inflamatória aguda.

Para realização desse modelo camundongos receberam uma injeção intrapleural contendo 250 ng/cavidade de LPS (*Escherichia coli* sorotipo O:111:B4 - Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) para promover a inflamação aguda ou salina estéril para controle negativo. Os animais foram eutanasiados

em diferentes tempos e as células da cavidade pleural recuperadas por meio de lavado com 2 mL de salina.

Para indução de gota os camundongos foram anestesiados com cetamina / xilazina (80:15 mg / kg) intra-peritoneal para receber a injeção dos cristais de MSU (100 µg) na articulação tibiofemoral. A lavagem periarticular foi realizada em diferentes momentos após a injeção de MSU (0, 2, 6, 10, 24 e 48 horas). Em outro experimento camundongos receberam o tratamento com inibidor do receptor MET (PF-04217903 40mg/Kg, gavagem) 6 horas após a injeção de MSU. Os camundongos foram sacrificados por sobredose de anestésico seguido por deslocamento cervical.

3.4- Tratamento para inibição de MET

Para avaliar o papel de MET na resposta inflamatória no modelo murino de pleurisia aguda e no modelo murino de gota aguda camundongos foram tratados com PF-04217903 (um inibidor de MET, AbMole BioScience, #3077) dissolvida em carboximetilcelulose (0,5% em salina). Os animais do grupo veículo receberam o veículo da droga (carboximetilcelulose 0,5% diluídos em salina) ambos administrados por via oral - gavagem. A gavagem foi realizada 6 horas após injeção de LPS e MSU, onde se encontra uma resposta inflamatória significativa. Quatro e seis horas após o tratamento as células foram recuperadas da cavidade pleural, através do lavado do local para posterior quantificação e análise.

3.5- Processamentos das células do lavado pleural

Os 2 mL de células recuperadas do lavado pleural foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 200 µl de PBS 1x, para realização da contagem total de leucócitos, caracterização morfológica ou bioquímica.

3.6- Contagem total dos leucócitos no modelo de pleurisia aguda

Alíquotas de 10 µL do lavado pleural foram diluídas em 90 µL de líquido de Turk (uma diluição de 10 vezes), para realização da contagem total dos leucócitos na câmara de Neubauer. A contagem foi realizada por meio do microscópio óptico (aumento de 40 x) e contador manual. O número de leucócitos adquiridos foi utilizado para posterior cálculo da contagem diferencial e para pipetagem da quantidade desejada para análises experimentais.

3.7- Contagem total dos leucócitos no modelo de gota

A cavidade periarticular foi lavada com PBS-BSA 3% (duas vezes com 5 µL cada) e adicionadas em um volume de 90 µL de PBS, sendo recuperados um volume final de 100 µL de células da cavidade periarticular. Alíquotas de 10µL do lavado periarticular foram diluídas em 20 µL de líquido de Turk (uma diluição de 3 vezes), para realização da contagem total dos leucócitos na câmara de Neubauer. A contagem foi realizada por meio do microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual. O número de leucócitos adquiridos foi utilizado para posterior cálculo da contagem diferencial.

3.8- Contagem diferencial de leucócitos

Para a realização da contagem diferencial as lâminas foram preparadas com uma alíquota contendo 100 mil células diluídas em PBS-BSA 3 % preparadas na cito-centrifugada. As lâminas foram coradas com o método de May-Grunwald-Giemsa, utilizando o kit Panótico Rápido (LB Laborclin, Pinhais, PR, BR), e as células foram diferenciadas morfológicamente em mononucleares (macrófagos e linfócitos) e neutrófilos não apoptóticos utilizando microscópio óptico e objetiva de imersão em óleo (aumento de 100 vezes). Foram contados três campos aleatórios de cada lâmina. Os resultados foram quantificados pelo número de cada tipo celular presente na cavidade

pleural, calculado pela percentual dessas células presentes nas lâminas pela quantidade de células obtidas na contagem total.

3.8.1- Caracterização morfológica de apoptose

Para caracterização morfológica da apoptose foram utilizadas as lâminas de contagem diferencial. A apoptose é caracterizada por células que apresentam diminuição de tamanho e condensação da cromatina, acarretando em um núcleo picnótico e/ou formação de corpos apoptóticos (Alessandri, AL e cols., 2013). Foram contadas cem células por lâmina, para determinar a proporção de células com morfologia apoptótica em campos aleatórios no microscópio óptico (aumento de 100 vezes). As fotos foram retiradas do microscópio óptico contendo a câmera Moticam 5.0 MP, sendo estas avaliadas através do programa *Motic Live Imaging Module*.

3.8.2- Caracterização morfológica de eferocitose

Para caracterização morfológica de células eferocíticas foram utilizadas as lâminas de contagem diferencial. A eferocitose é caracterizada por macrófagos contendo neutrófilos apoptóticos no seu interior. Foram contadas cem células por lâmina, para determinar a proporção de células com característica de eferocitose em campos aleatórios no microscópio óptico (aumento de 100 vezes). As fotos foram retiradas do microscópio óptico contendo a câmera Moticam 5.0 MP no aumento de 100x, sendo estas avaliadas através do programa *Motic Live Imaging Module*.

3.9- Caracterização bioquímica da apoptose

Para caracterização bioquímica da apoptose foi realizado a técnica citometria de fluxo (usando Becton Dickenson FACScan e CELL quest software). Para essa análise foram coletadas a mesma quantidade de células

(2×10^5) de todas as amostras do lavado pleural e essas células foram marcadas com anexina-V e iodeto de propídeo utilizando kit de reagentes específicos (BD Paharmingen Annexin V-FITC –BD Biosciences). Durante a apoptose as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas para sinalizar o processo de morte celular. A presença da fosfatidilserina (PS) na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorrem e que serve como sinalização para reconhecimento de fagócitos para posterior remoção dessas células. A anexina-V é uma proteína de ligação para PS exposta na superfície das células apoptóticas. O iodeto de propídeo foi utilizado para excluir as células que tenham perdido a integridade de membrana ou tenham sofrido necrose (Alessandri, AP e cols., 2013).

3.9.1-Marcação extracelular: Para caracterizar os neutrófilos fizemos uma marcação extracelular com anticorpo Ly6G. Para fazer a marcação, as células do lavado pleural e periarticular foram centrifugadas a 1700 rpm por 8 minutos e o sobrenadante descartado. Antes de adicionar o anticorpo para marcação de neutrófilos, o *pellet* foi ressuscitado em 10 μ L de Fc block diluídos em PBS/BSA 1 % em cada amostra (BD Bioscience, San Jose,CA, USA) para não avaliar na leitura a ligação inespecífica da porção Fc dos anticorpos. Posteriormente as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4°C, protegido de luz. Em seguida foram realizadas as marcações de superfície com 10 μ L Ly6G (APC – BD Bioscience, San Diego, CA, USA), F4/80 (PE-Cy7-eBioscience, San Diego, CA, USA) diluídos em PBS/BSA 1% e incubados por 30 minutos a 4°C, protegido de luz. Após esse tempo foram adicionados nas amostras 150 μ L de PBS/BSA 2 % no intuito de parar reação do anticorpo. Em seguida as amostras foram centrifugadas e o *pellet* ressuscitado em 100 μ L do tampão presente no kit, depois foi adicionada 2 μ L de anexina e PI, incubou por 15 minutos protegido de luz para posterior leitura no citômetro.

Durante a leitura foram realizadas as marcações dos isotipos dos anticorpos, anexina-V, PI e o controle negativo, no intuito de estabelecer o limite dos quadrantes das amostras, as quais contém a presença de todas as marcações utilizadas. O resultado da marcação amostras foi analisadas no software FlowJo 7.5.3 (Treestar, Ashland, OR, USA) através de um *gate* de

seleção do número total de leucócitos. Posteriormente, as células presentes nesse *gate* foram avaliadas por histograma para determinação de células expressando Ly6G⁺, excluindo os macrófagos expressando F4/80⁺. Em seguida foi analisado a presença de apoptose em células Ly6G⁺ (neutrófilos), através da marcação com anexina V FITC.

3.10- Caracterização da expressão de P-MET por citometria de fluxo

Para caracterização da expressão de P-MET foi realizado a técnica citometria de fluxo (usando Becton Dickenson FACScan e CELL quest software) das amostras do lavado periarticular. A marcação extracelular está descrita no item 3.8.1 e, posteriormente, foi realizado a marcação intracelular.

Marcação intracelular: Após a marcação extracelular as células foram lavadas e fixadas em formaldeído 2 %, à temperatura ambiente lavadas com PBS 1x gelado e posteriormente foi realizado a permabilização das células com 100 µl de metanol 90 % gelado. As células foram colocadas 30 minutos no gelo, após esse tempo as amostras foram centrifugadas a 1700 rpm por 8 minutos. O sobrenadante descartado e o *pellet* então ressuspendido e incubado com 20 µL de anticorpo primário anti-P-MET (Cell signaling) diluídos em PBS/BSA 1% para marcação intracelular durante 60 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Posteriormente foram adicionados nas amostras 150µL de PBS 1x gelado, no intuito de parar reação do anticorpo. Em seguida as amostras foram centrifugadas e o *pellet* ressuspendido com 20 µL do anticorpo secundário anti-rabbit (APC – BD Bioscience, San Diego, CA, USA) e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Após esse tempo foram adicionados nas amostras 150 µL de PBS 1x gelado, no intuito de parar reação do anticorpo. Em seguida as amostras foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS/BSA 1 % para posterior leitura.

Durante a leitura foi realizada as marcações dos isotipos dos anticorpos utilizados, e o controle negativo, no intuito de estabelecer o limite dos quadrantes das amostras, as quais contém a presença de todas as marcações utilizadas. O resultado das amostras foi analisadas no software FlowJo 7.5.3

(Treestar, Ashland, OR, USA) através de um *gate* de seleção do número total de leucócitos das amostras. Posteriormente as células presentes nesse *gate* foram avaliadas por histograma para determinação de células expressando Ly6G⁺. Em seguida foi avaliada a atividade de MET em neutrófilos expressando MET⁺ e Ly6G⁺.

3.11- Avaliação de hipernocicepção no modelo de gota

A avaliação da hipernocicepção é um teste de pressão crescente na pata de camundongo nesse teste foi utilizando um anestesímetro eletrônico (Insight Equipamentos, São Paulo, Brazil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força (g). O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 4,15 mm² de diâmetro. Os animais foram alocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 10 x 17 cm, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região das patas dos animais. Foi aplicado, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar 3 medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a média de três valores em gramas (força) 10 horas após o desafio com MSU. Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 9:00 h.

3.12- Purificação de neutrófilos humanos (*in vitro*).

Para realização do ensaio *in vitro* com neutrófilos humanos, foi feita a purificação do sangue periférico de pelo menos 3 doares diferentes saudáveis

maiores de 18 anos. O isolamento de neutrófilos foi realizado a partir de um gradiente de densidade, utilizando Histopaques de densidades diferentes (1.077g/ml e 1.119g/ml) de acordo com as instruções do fabricante (Histopaque 1077 e Histopaque 1119 - Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Para isso, o sangue coletado dos doadores foi diluído duas vezes em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) e colocado, delicadamente, acima das camadas de Histopaque em tubo de 15ml, na proporção de 6ml de Histopaque para 6 ml de sangue diluído em RPMI. Os tubos foram centrifugados (1300 rpm, sem freio) por 30 minutos, à temperatura ambiente e haverá formação de camadas de acordo com densidades. A camada de neutrófilos foi coletada com auxílio de pipeta de Pasteur e lavada com RPMI, por meio de centrifugação (1500 rpm, sem freio) por 15 minutos, à temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de RPMI e as hemácias foram lisadas com auxílio de ACK (para lise). Após centrifugação (1500 rpm, sem freio), alíquota da amostra de cada doador foi diluída 10 vezes em azul de tripan (para exclusão de células mortas) e neutrófilos foram contados na câmara de Neubauer (como descrito no item **3.6**). Através da contagem total de neutrófilos foi feito plaqueamento da mesma quantidade de células em cada poço da placa de 96 poços (5×10^5 por poço) em meio RPMI-1640 com adição de 10% de soro autólogo, submetidos aos tratamentos necessários e incubados em estufa com atmosfera umidificada, 5% de CO₂ e à 37°C.

3.13- Tratamento com PF-04217903

Para avaliar o papel de MET na sobrevivência de neutrófilos humanos, estes foram plaqueados em placa de 96 poços e divididos em grupo controle, o qual recebeu o diluente da droga (DMSO), o grupo tratado PF-04217903 (em diferentes concentrações 1 mM, 3 µM, 30 µM, 100 µM; AbMole BioScience, #3077) e grupo zVAD-fmk o qual recebeu o tratamento e adição do zVAD-fmk (750 ng) que é um pan-inibidor de caspases. Horas após a cultura as células foram coletadas para análise bioquímica como descrito no item **3.8**.

3.14- Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando o software *GraphPad Prism 5.0*. As análises entre os grupos foram feitas pelo teste T de Student. No caso de três ou mais grupos, foi realizada análise de variância (One-way ANOVA), seguida do pós-teste Newman-Keuls ou Tukey. Os resultados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média) e o nível de significância foi definido como $p < 0.05$.

4-RESULTADOS:

4.1 A inibição de MET reduz o acúmulo de neutrófilos na cavidade pleural.

O primeiro passo foi avaliar se a inibição de MET poderia alterar o curso da resposta inflamatória. Para isso, tratamos os animais com a droga PF-04217903 (40mg/Kg, gavagem), seis horas após o desafio com LPS (250 ng/cavidade, i.pl.), tempo no qual a resposta inflamatória já estava estabelecida (Vago, JP e cols., 2016). Quatro horas após o tratamento, as células foram coletadas e analisadas (**Figura 10A**). O tratamento com o PF-04217903 foi capaz de diminuir o número total de células e de neutrófilos presentes na cavidade pleural, sem alterar o número de células mononucleares (**Figura 10B-D**). Esses dados sugerem que o tratamento com o inibidor de MET pode reduzir o acúmulo de neutrófilos induzida por LPS na cavidade pleural.

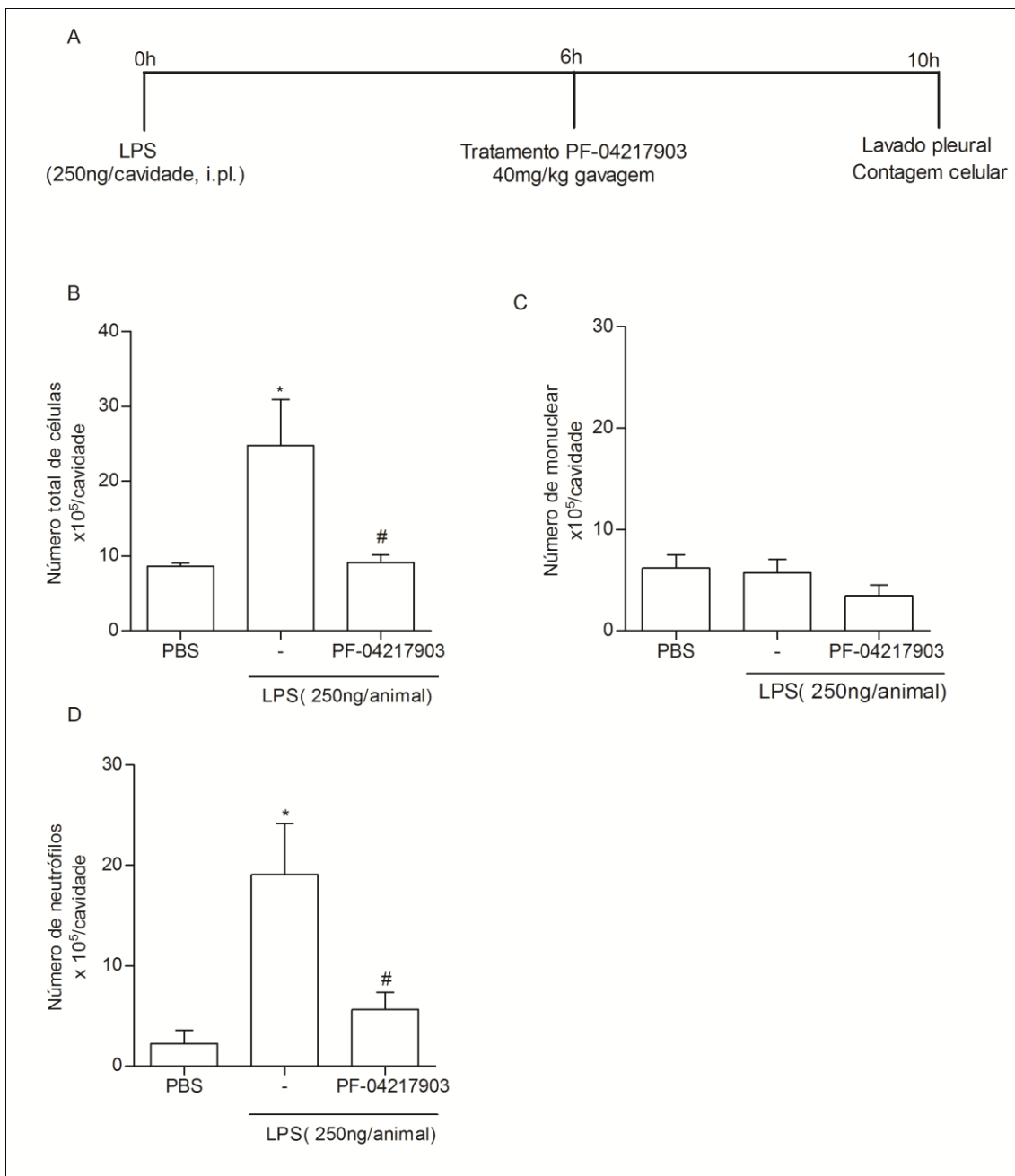


Figura 8: Efeito do tratamento com PF-04217903 no acúmulo de leucócitos na cavidade pleural após a injeção de LPS. Representação esquemática do protocolo de indução de pleurisia (A). Os camundongos foram injetados com PBS ou LPS (250 ng/cavidade, i.pl.) e 6 horas depois receberam por via oral PF-04217903 (40 mg/Kg, gavagem) ou veículo (0,5 % de carboximetilcelulose em salina) as células presentes na cavidade pleural foram coletadas 4 horas após o tratamento com a droga ou o veículo e processadas para posterior análises. Número total de células (B), mononuclear (C), neutrófilos (D). Os resultados são expressos como o número absoluto de células presentes na cavidade pleural e são mostrados com média \pm EPM de pelo menos quatro animais em cada grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com

camundongos injetados com PBS e # $P < 0,05$ quando comparado com animais injetado com LPS.

4.2 A inibição de MET promove o *clearance* de neutrófilos na cavidade pleural pela indução de apoptose seguida de eferocitose.

Em seguida, verificamos se a diminuição de neutrófilos na cavidade pleural estava associada à apoptose seguida de eferocitose dessas células, processos essenciais para a resolução do processo inflamatório. Através da análise morfológica, foi verificado um aumento de neutrófilos apoptóticos no grupo tratado com PF-04217903 (**Figura 11B-C**). Além disso, houve um aumento de eferocitose após o tratamento com PF-04217903 em relação ao grupo não tratado. Exemplos de neutrófilos viáveis (asteriscos), apoptóticos (cerquilha) e eferocitose de neutrófilos (seta) estão representados nas fotos retiradas do microscópio óptico no aumento de 100x (**Figura 11D**).

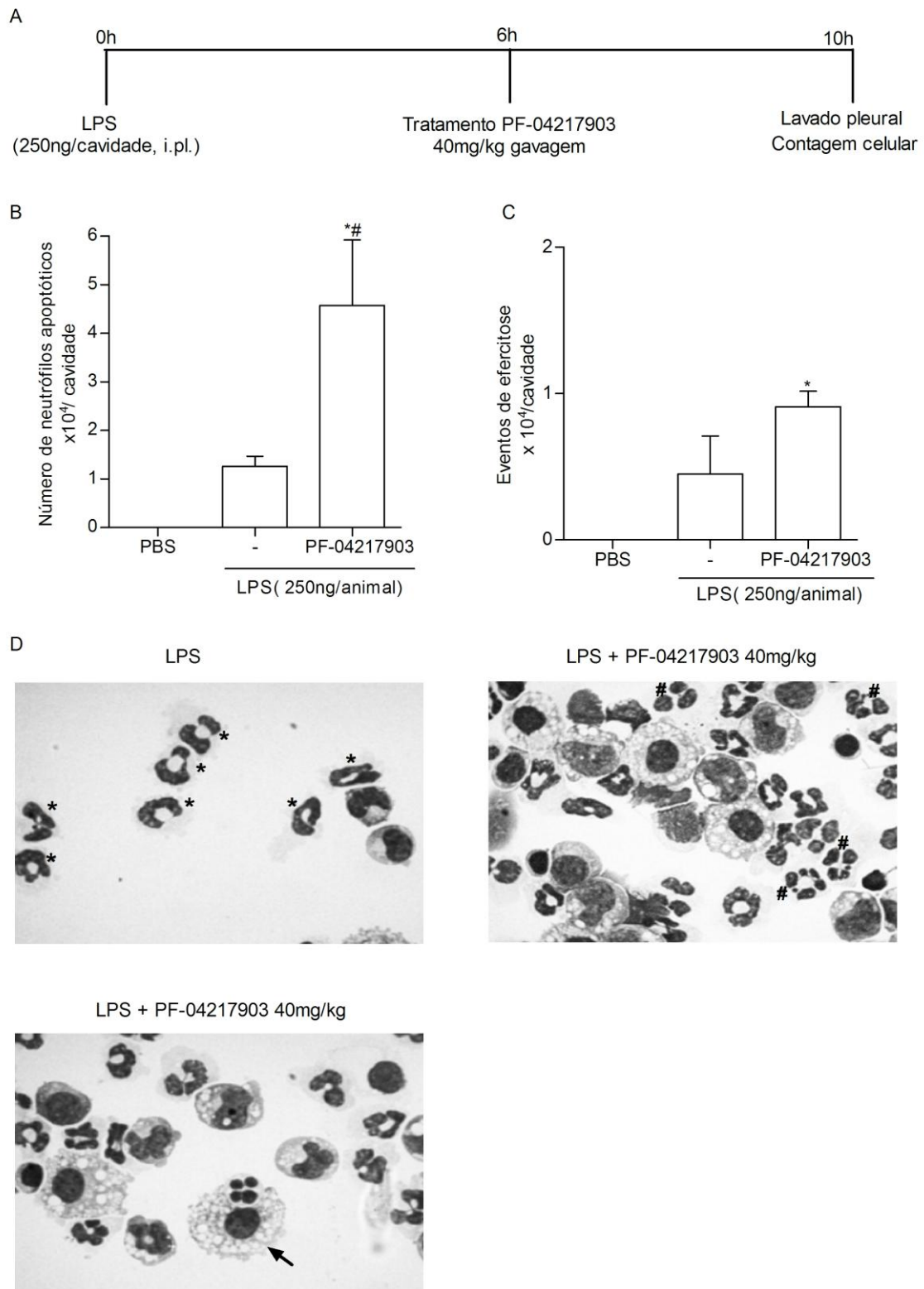


Figura 9: Efeito do tratamento com PF-04217903 na indução de apoptose de neutrófilos e efercitose avaliada morfologicamente na cavidade pleural após a injeção de LPS. Representação esquemática do protocolo de indução de pleurisia (A).

Os camundongos foram injetados com PBS ou LPS (250ng/cavidade, i.pl.) e 6 horas depois receberam por via oral PF-04217903 (40mg/Kg, gavagem) ou veículo (0,5% de carboximetilcelulose em salina) as células presentes na cavidade pleural foram coletadas 4 horas após o tratamento com a droga ou o veículo e processadas para posterior análises. Os resultados são expressos em número de células neutrófilicas apoptóticas presentes na cavidade pleural (B). E em células apoptóticas dentro de células mononucleares (C) e são mostrados com média \pm EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com camundongos injetados com PBS e # $P < 0,05$ quando comparado com animais LPS. (D) Imagem representativa de neutrófilos viáveis em animal não tratados (*) e no animal tratado com PF-04217903 neutrófilos apoptóticos (#) e eferocitose (seta).

Para confirmar os resultados obtidos morfológicamente (**Figura 11**), foi feita a análise bioquímica, utilizando a marcação com anexina-V, das células recuperadas do lavado pleural no mesmo tempo da análise morfológica (4 horas após o tratamento com a droga PF-04217903). Ao analisar as células da cavidade pleural, verificou-se um aumento do número de neutrófilos apoptóticos $\text{Ly6G}^+\text{anexina-V}^+$ no grupo tratado (**Figura 12 B**), porém não observamos diferença significativa. Entretanto, ao analisar as células da cavidade pleural 6 horas após o tratamento com o PF-04217903 verificou-se diminuição de neutrófilos e um aumento do número de neutrófilos apoptóticos ($\text{Ly6G}^+\text{anexina-V}^+$), confirmando os dados morfológicos (**Figura 13B**).

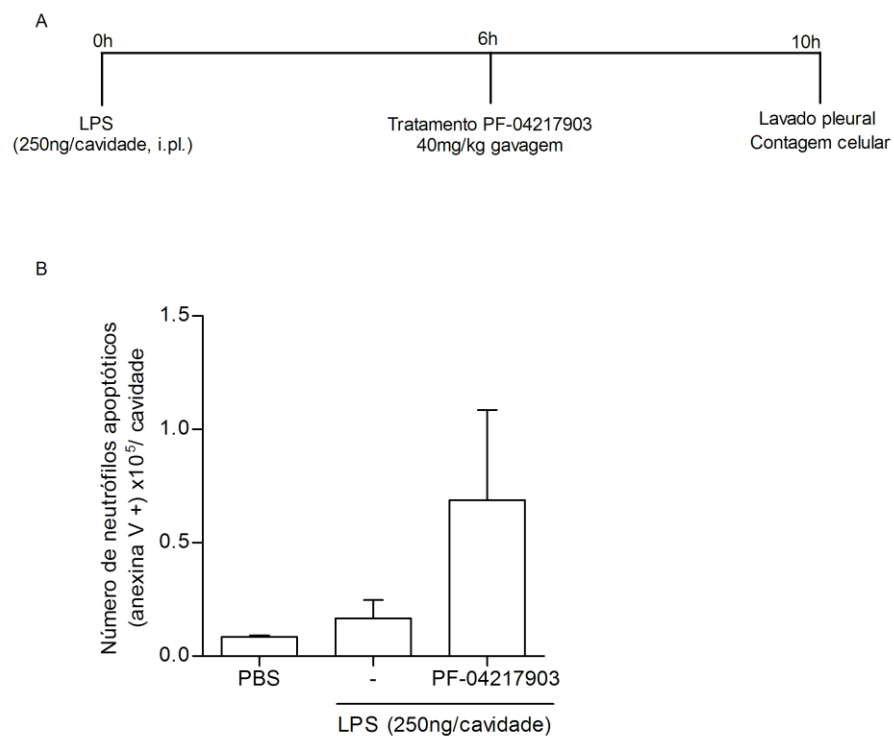


Figura 10: Efeito do tratamento com PF-04217903 na apoptose de neutrófilos avaliada bioquimicamente na cavidade pleural após a injeção de LPS. Os camundongos foram injetados com PBS ou LPS (250 ng / cavidade, i.pl.) e 6 horas depois receberam por via oral PF-04217903 (40mg/Kg, gavagem) ou veículo (0,5% de carboximetilcelulose em salina) as células presentes na cavidade pleural foram coletadas 4 horas após o tratamento com a droga ou o veículo e processadas para posterior análise no citômetro de fluxo. Representação esquemática do protocolo de indução de pleurisia (A). Número de neutrófilos apoptóticos (B). Os resultados são expressos como o número de neutrófilos apoptóticos presentes na cavidade pleural através da contagem total de células e a porcentagem de células apoptóticas e são mostrados com média \pm EPM de pelo menos quatro animais em cada grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com camundongos injetados com PBS.

e processadas para posterior análise no citômetro de fluxo. Figuras representativas mostram porcentagem de neutrófilos apoptóticos do lavado pleural realizada no citômetro de fluxo (B). Número de células neutrófilicas apoptóticas (C). Os resultados são expressos como o número de neutrófilos apoptóticos presentes na cavidade pleural através da contagem total de células e a porcentagem de células apoptóticas e são mostrados com média \pm EPM de pelo menos quatro animais em cada grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com camundongos injetados com PBS.

4.3 A expressão do receptor MET em neutrófilos infiltrados na cavidade articular após injeção de cristais de MSU

A partir de agora, investigamos algumas funções do receptor MET durante a resposta inflamatória aguda induzida pela injeção de cristais de MSU, no modelo murino de gota. Inicialmente, avaliamos a expressão de MET na superfície de neutrófilos recuperados da cavidade articular tibiofemoral em diferentes momentos após a injeção de cristais de MSU. Como pode ser observado na **Figura 14**, houve uma baixa expressão de MET nas primeiras horas após a injeção de cristais de MSU. Porém, após 10 horas do estímulo, observou um aumento do número total de células, número de neutrófilos, e um elevado número de neutrófilos expressaram MET, presentes na cavidade (**Figura 14B-C-D**). Nos tempos subsequentes, a quantidade de neutrófilos expressando MET retornaram para valores basais.

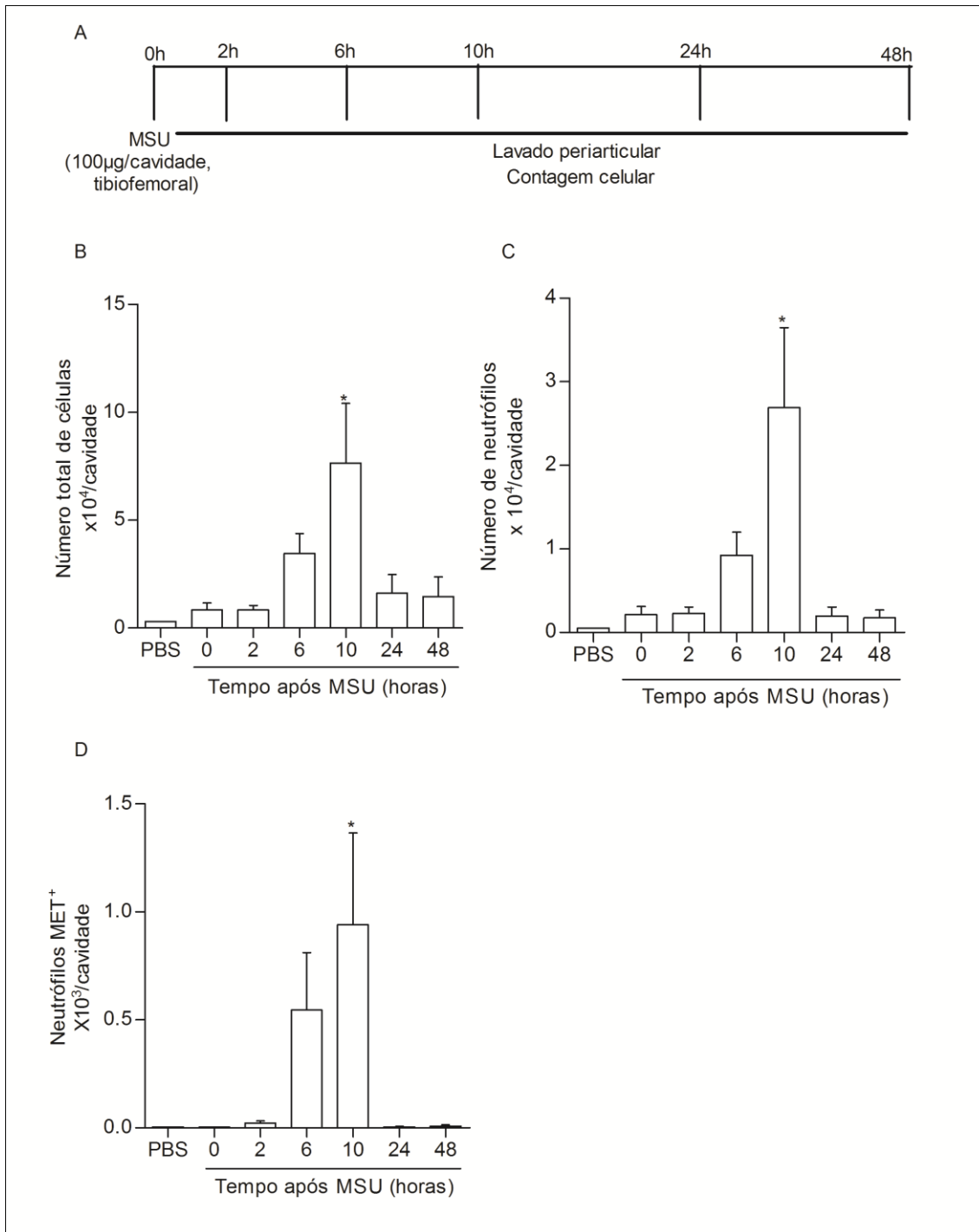


Figura 12: Cinética da expressão do receptor de MET durante inflamação aguda de gota induzida por MSU. Representação esquemática do protocolo de indução de gota (A). Os camundongos foram injetados com PBS ou MSU (100 µg/cavidade tibiofemoral) e as células presentes na cavidade periarticular foram coletadas em vários tempos e processadas para analisar a expressão de MET pela técnica citometria de fluxo. Nos resultados são expressos o número de células totais (B). Número de neutrófilos (C) e número de neutrófilos expressando MET na cavidade tibiofemoral (D). Os resultados são mostrados com média ± EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. *, P<0,05, quando comparado com camundongos injetados com PBS.

4.4 A inibição de MET reduz o acúmulo de neutrófilos na cavidade periarticular induzida por MSU

Após verificar os resultados obtidos que mostram que PF-04217903 aumenta a apoptose de neutrófilos no modelo de pleurisia, o próximo passo foi avaliar se esse evento se repete no modelo murino de gota aguda. Para isso, tratamos os animais com a droga PF-04217903 (40mg/Kg, gavagem), seis horas após o desafio com MSU (100 µg/cavidade tibiofemoral). O tratamento com PF-04217903, não promoveu uma diferença significativo no número total de células (**Figura 15B**). Porém foi observado um aumentou significativo de células mononucleares presentes na cavidade articular (**Figura 15C**). Por outro lado, houve uma redução no número de neutrófilos no grupo tratado com PF-04217903, em relação ao grupo veículo, porém não teve diferença significativa (**Figura 15D**). Esses dados mostram que o tratamento com o inibidor de MET pode induzir resolução da resposta inflamatória aguda induzida por cristais de MSU.

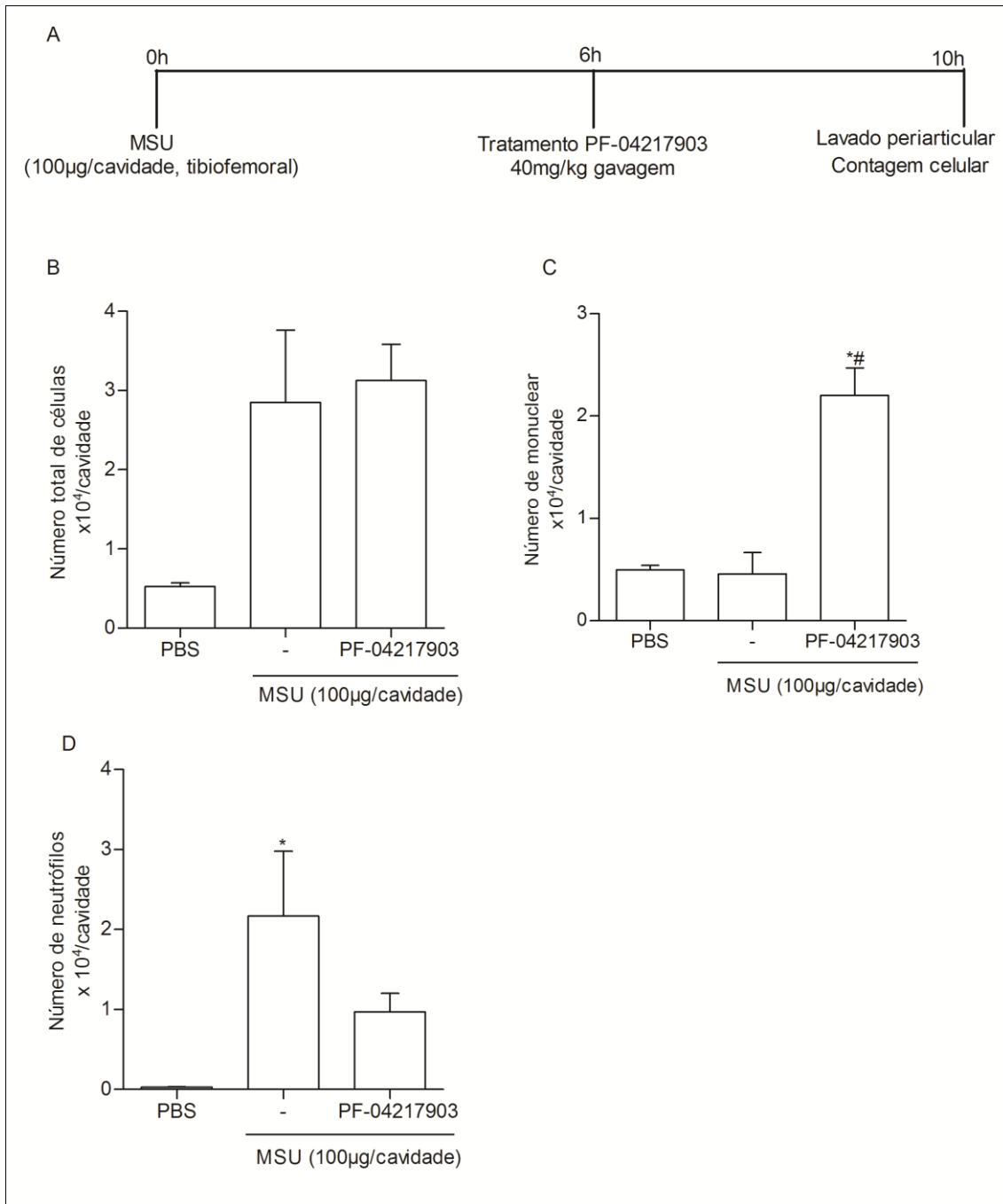


Figura 13: Efeito do tratamento com PF-04217903 no acúmulo de leucócitos na cavidade periarticular após a injeção de MSU. Representação esquemática do protocolo de indução de gota (A). Os camundongos foram injetados com PBS ou MSU (100 µg/cavidade tibiofemoral) e 6 horas depois receberam por via oral PF-04217903 (40mg/Kg, gavagem) ou veículo (0,5% de carboximetilcelulose em salina) as células presentes na cavidade periarticular foram colhidas 4 horas após o tratamento com a droga ou o veículo e processadas para posterior análises. Número total de células (B), mononuclear (C) e neutrófilos (D). Os resultados são expressos como o número de neutrófilos ou células mononucleares presentes na cavidade articular e são mostrados com média ± EPM de pelo menos quatro animais em cada grupo. *, P<0,05 quando

comparado com camundongos injetados com PBS e # $P < 0,05$ quando comparado com animais MSU.

4.5 A inibição de MET promove a apoptose e eferocitose de neutrófilos na cavidade periarticular

Em seguida, quantificamos neutrófilos apoptóticos e a eferocitose presentes na cavidade periarticular, que são importantes eventos durante a resolução do processo inflamatório. Através da análise morfológica, foi verificado um aumento de neutrófilos apoptóticos no grupo tratado com PF-04217903 (**Figura 16B**). Foi observado um aumento da eferocitose após o tratamento com PF-04217903 em relação ao grupo não tratado, porém não houve um aumento significativo (**Figura 16C**). Para confirmar esse achado, utilizaremos futuramente um modelo de injeção de cristais de MSU na cavidade peritoneal, onde é possível recuperar uma maior quantidade de células e, conseqüentemente, facilitará as análises. Exemplos de neutrófilos viáveis (asteriscos) e apoptóticos (cerquilha) estão representados (**Figura 16D**).

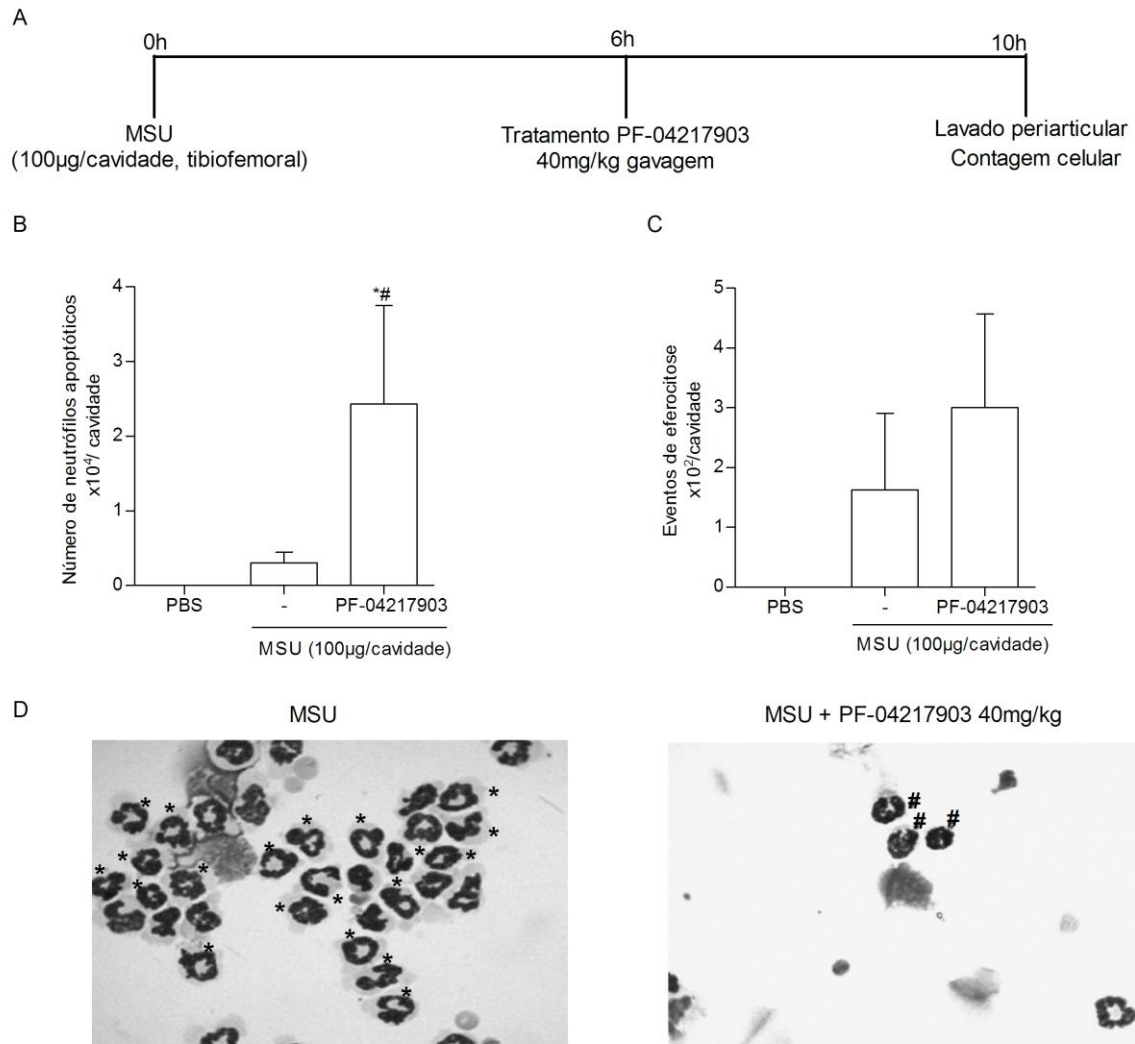


Figura 14: Efeito do tratamento com PF-04217903 na indução de apoptose e eferocitose de neutrófilos na cavidade periarticular após a injeção de MSU. Representação esquemática do protocolo de indução de gota (A). Os camundongos foram injetados com PBS ou MSU (100 µg/cavidade tibiofemoral) e 6 horas depois receberam por via oral PF-04217903 (40mg/Kg, gavagem) ou veículo (0,5% de carboximetilcelulose em salina). As células presentes na cavidade periarticular foram coletadas 4 horas após o tratamento com a droga ou o veículo e processadas para posterior análises. Células com características apoptóticas (B). Os resultados são expressos em número de células neutrófilicas apoptóticas presentes na cavidade periarticular (B). E em células apoptóticas dentro de células mononucleares (C) e são mostrados com média \pm EPM de pelo menos cinco animais em cada grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com camundongos injetados com PBS e # $P < 0,05$ quando comparado com animais MSU. (D) Imagem representativa de neutrófilos viáveis em animal não tratados (*) e no animal tratado com PF-04217903, neutrófilos apoptóticos (#).

Um dos cinco sinais cardeais da inflamação é a dor desencadeada através da sensibilização dos nociceptores localizados nas fibras aferentes periféricas especializadas. Assim, nós avaliamos a resposta hipernociceptiva articular mecânica após a injeção de cristais de MSU em animais tratados ou não com PF-04217903. Os camundongos que receberam a injeção intra-articular de cristais de MSU suportaram por menos tempo a pressão da pata, retirando-a mais rapidamente quando comparada com o grupo controle. Essa análise caracteriza uma redução do limiar hipernociceptivo em relação aos animais controle, injetados com PBS. De maneira interessante, o tratamento com PF-04217903 foi capaz de reverter a resposta hipernociceptiva induzida por cristais de MSU, quando o limiar de retirada da pata manteve-se em níveis basais (**Figura 17B**).

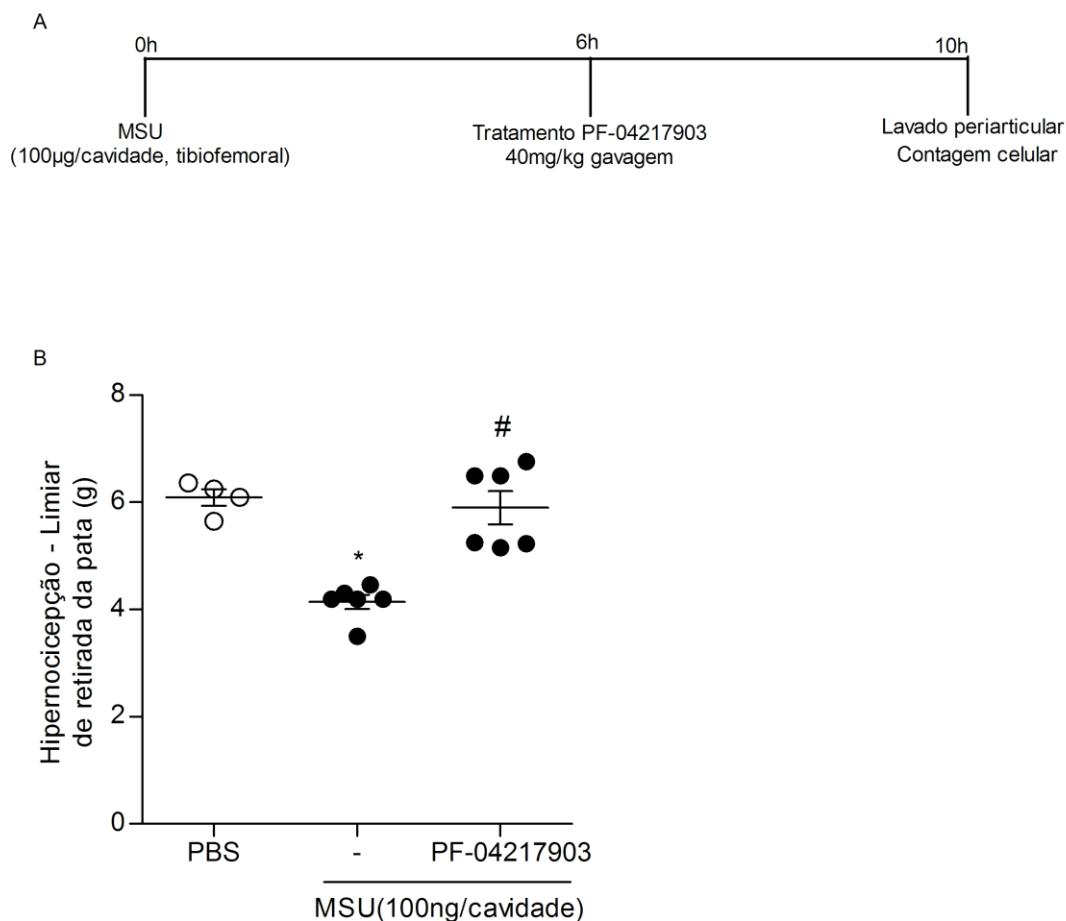


Figura 15: Efeito do tratamento com PF-04217903 na hipernociceção no modelo de gota induzida por MSU. Representação esquemática do protocolo de indução de gota (A). Foram administrados nos camundongos PBS ou cristais de MSU (100 µg/intra-articular) por injeção periarticular e 6 horas depois receberam por via oral PF-04217903 (40 mg/Kg, gavagem) ou veículo (0,5 % de carboximetilcelulose em salina). A intensidade de hipernociceção foi avaliada 10 horas após a injeção de MSU e está representada como o limiar de retirada da pata sob o estímulo (B), mostrados como a média ± EPM de pelo menos quatro animais em cada grupo. * $P < 0,05$ quando comparado com camundongos injetados com PBS e # $P < 0,05$ quando comparado com animais MSU, este experimento foi repetido e se obteve o mesmo resultado.

4.6 Inibição de MET promove a apoptose de neutrófilos humanos in vitro.

O próximo passo foi verificar o efeito do inibidor de MET em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos purificados do sangue periférico foram incubados por 1 e 2 horas sem a presença do soro, com PF-04217903 na concentração 1 mM e zVAD-fmk na concentração 750 ng que é um o pan-

inibidor de caspases. Neutrófilos incubados apenas com o veículo utilizado para a diluição do PF-04217903 apresentaram uma marcação reduzida de anexina-V, indicando um baixo número de células apoptóticas. Já os neutrófilos incubados com inibidor de MET apresentaram uma maior porcentagem de apoptose quando comparados com as células incubadas apenas com o veículo da droga. Por outro lado, os poços que foram adicionados o inibidor de MET juntamente com o zVAD-fmk, mostrou uma redução da marcação de anexina-V (**Figura 18**). Em conjunto, os resultados indicam que o inibidor de MET promove apoptose tanto em neutrófilos murino como em neutrófilos humano.

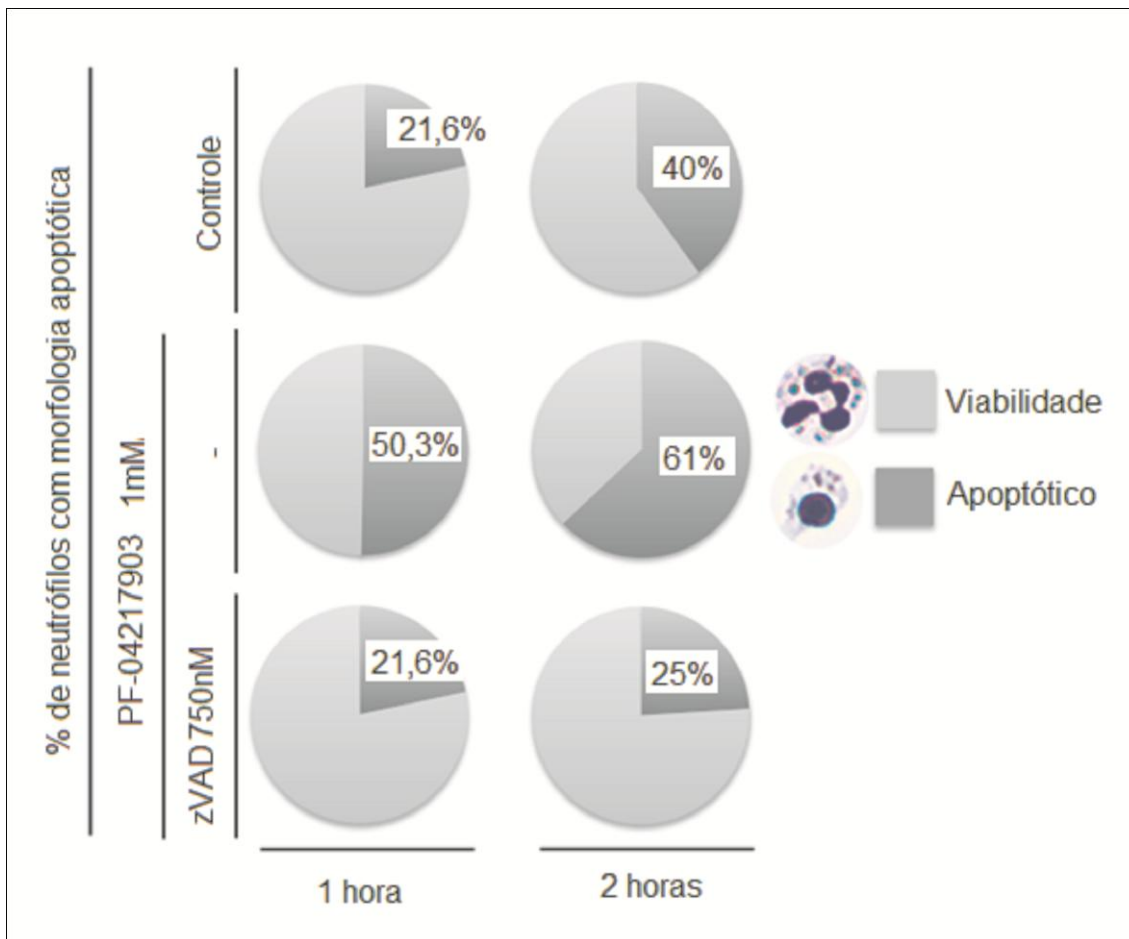


Figura 16: Efeito do tratamento de PF-04217903 e zVAD-fmk em cultura de neutrófilos humanos do sangue periférico. O sangue foi coletado de indivíduos saudáveis e posteriormente purificado. Foi feita a incubação 2×10^5 de células em meio RPMI por poço, contendo 1mM veículo (DMSO) ou 1mM PF-04217903 ou 750 ng de zVAD-fmk. As células foram avaliadas após 1 e 2 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Avaliação da apoptose foi feita pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados são expressos como porcentagem de pool de neutrófilos por doador (A = 4 doadores) e são mostrados com média \pm EPM. * $P < 0,05$ quando comparado com grupo controle.

Posteriormente, notou a necessidade de ser avaliada a cultura de neutrófilos humanos purificados do sangue periférico na presença de soro autólogo, LPS e uma análise de dose-resposta do inibidor de MET. Vale a pena ressaltar que o inibidor de MET é altamente seletivo, entretanto, a dose utilizada no primeiro experimento estava acima do IC_{50} (variando de 5 a 150 nM quando testado em linhagens de células tumorais e 0,02 á 2 μM quando testado em linhagens de células endoteliais) descrito na literatura (<http://www.abmole.com/products/pf-04217903.html>). Em razão disso, os

neutrófilos foram incubados por 10 horas com 10% do soro autólogo, LPS e PF-04217903 em diferentes concentrações, 3 μ M, 30 μ M e 100 μ M. Neutrófilos incubados com LPS, soro e com o veículo utilizado para a diluição do PF-04217903 apresentaram uma marcação reduzida de anexina-V, indicando um baixo número de células apoptóticas. Por outro lado, os neutrófilos incubados com inibidor de MET, LPS e o soro apresentaram uma maior porcentagem de apoptose quando comparados com as células incubadas apenas com o veículo da droga (**Figura 19**). Em conjunto, os resultados indicam que o inibidor de MET promove apoptose tanto em neutrófilos murinos como em neutrófilos humanos. Além disso, os dados *in vitro* demonstram que o soro autólogo pode ter um efeito protetor dos neutrófilos.

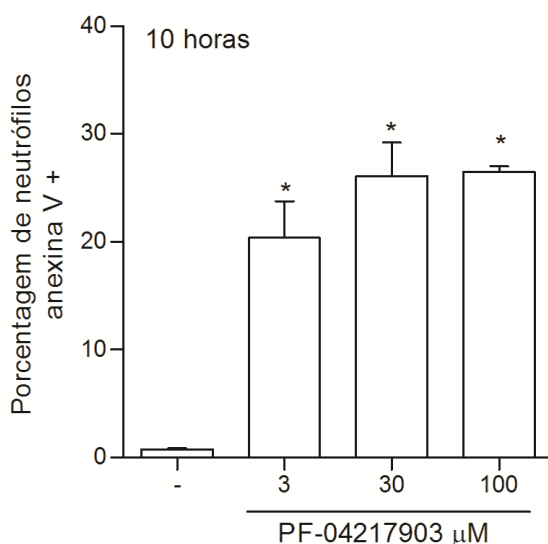


Figura 17: Efeito do tratamento de PF-04217903 em cultura de neutrófilos humanos do sangue periférico. Neutrófilos humanos foram purificados de sangue periférico, coletado de indivíduos saudáveis e, então incubados com 3 μ M, 30 μ M e 100 μ M PF-04217903 ou veículo (DMSO) por poço, contendo 10% de soro autólogo, LPS (100ng/poço). As células foram avaliadas após 10 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Avaliação da apoptose foi feita pela técnica de citometria de fluxo. Os resultados são expressos como porcentagem de células apoptóticas por doador (A = 3 doadores) e são mostrados com média \pm EPM. * P<0,05 quando comparado com grupo controle.

5- DISCUSSÃO

A resposta inflamatória é um processo fisiológico no qual as células e mediadores colaboram para neutralizar e eliminar estímulos prejudiciais ao organismo. Uma resposta auto-limitante promove a proteção do hospedeiro, uma vez que este mantém a arquitetura e função do local inflamado (Alessandri, AL e cols., 2013). A resolução da inflamação é um processo ativo, que promove o retorno da homeostase de um tecido inflamado e é coordenada e controlada por uma variedade de moléculas intracelulares e extracelulares. Com o término do estímulo inflamatório, ocorre diminuição da síntese mediadores inflamatórios no local e aumento do catabolismo dessas moléculas (Perez, DA e cols., 2014; Serhan, CN e cols., 2008). O conhecimento crescente da resolução da inflamação como eventos, mediadores e mecanismos envolvidos nessa fase, tem trazido novas oportunidades terapêuticas para controlar a inflamação (Sousa, LP e cols., 2013).

Foi demonstrado neste trabalho que no modelo murino de pleurisia induzida por LPS a inibição farmacológica de MET no momento em que há uma maior presença de neutrófilos na cavidade pleural (1) reduziu o número de neutrófilos no local, (2) induziu a apoptose de neutrófilos e (3) aumentou a capacidade eferocítica dos neutrófilos apoptóticos in vivo. Além disso, no modelo murino de gota induzido por MSU foi demonstrado que (4) a ativação de MET está relacionada com a fase produtiva da inflamação aguda induzida por cristais de MSU e que a inibição farmacológica de MET no pico da inflamação neutrófilica (5) reduziu o número de neutrófilos na cavidade periarticular, (6) induziu a apoptose de neutrófilos e (7) reduziu a hipernocicepção articular. Ao avaliar a presença do inibidor em neutrófilos humanos observou-se que (8) a inibição de MET também induziu a apoptose de neutrófilos humanos. Assim, o inibidor de MET, PF-04217903, pode ser um potencial alvo terapêutico para doenças inflamatórias agudas.

Nossos dados demonstraram que a diminuição do acúmulo de neutrófilos induzida após o tratamento com PF04217903 na cavidade pleural desafiada

com LPS ou na cavidade periarticular desfiada com MSU está relacionada com um aumento da apoptose dependente da ativação de caspase dessas células. Contudo, ainda não havia estudos demonstrando que MET poderia regular a sobrevivência de neutrófilos *in vivo*.

A apoptose é um processo de morte celular, caracterizado pela fragmentação nuclear e pela formação de corpos apoptóticos (Ankarcrona, M e cols., 1995). Ao contrário da necrose, a apoptose não promove a liberação do conteúdo celular para o interstício e, conseqüentemente, não promove a inflamação ao redor das células mortas (Wyllie, HA, 1980). A apoptose desempenha um papel importante na resolução das doenças inflamatórias. As células apoptóticas reduzem sinais inflamatórios, através da liberação de moléculas que inibem influxo de novos granulócitos, atraem monócitos não-flogísticos e reprograma os macrófagos no tecido (Sousa, PL e cols., 2013). Várias vias regulam a sobrevivência e a morte de leucócitos no sítio inflamatório e compreender esses mecanismos é essencial para avaliar e desenvolver novas estratégias terapêuticas. Sendo assim, fatores que impedem o recrutamento excessivo de neutrófilos e danos teciduais são essenciais para promover a resolução da inflamação (Vago, JP e cols., 2016). A inibição farmacológica de MET em uma determinada fase da inflamação aguda seria um grande potencial para estudos da resolução da resposta inflamatória. Observou também que a apoptose induzida pela inibição de MET foi específica para neutrófilos, uma vez que não foi observado apoptose de células mononucleares após tratamento com PF-04217903. Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que a indução de apoptose em neutrófilos ocorre através do aumento de AMP cíclico e inibição de PI3K e NF- κ B, é eficaz para a indução da resolução da resposta inflamatória (Sousa, PL e cols., 2013). Já se foi visto também que o pré-tratamento com inibidores de PI3K impede o recrutamento de eosinófilos no local da inflamação, associado à inibição da fosforilação de Akt e o aumento do número de eventos apoptóticos (Pinho, V e cols., 2005). Além disso, trabalhos seminais destacaram a importância do aumento de AMP cíclico e inibição de PI3K e NF- κ B para a resolução da inflamação. Esses trabalhos demonstraram que a inibição da via intracelulares quinases dependentes de ciclina (CDKs) substituem de fatores de

sobrevivência e induziam apoptose de neutrófilos dependente de caspase, promovendo uma diminuição do processo inflamatório (Rossi, AG e cols., 2006; Talvani, A e cols., 2009). Serhan e colaboradores, descreveram os mediadores pró-resolutivos lipídicos, tais como lipoxinas, resolvinas e protectinas e demonstraram que esses mediadores são capazes de induzir a apoptose de neutrófilos e, conseqüentemente, induzir a resolução da inflamação (Serhan, CN e cols., 2008). Podemos afirmar que a apoptose é um fenômeno crucial para que haja resolução da inflamação, uma vez que a diminuição do reconhecimento de células apoptóticas causa uma inflamação mais prolongada (Thatte, U e Dahanukar, S, 1997).

A membrana celular é composta por uma bicamada lipídica e a fosfatidilserina fica organizada no folheto interno dessa membrana. A ativação de caspase promove apoptose celular e externalização dos fosfolípídeo PS (Fosfatidilserina) por ação enzimática, que serve como um sinal de morte celular. Além disso, foi demonstrado que lipossomas que expressam fosfatidilserina são capazes de induzir reconhecimento de macrófagos e reduzir a resposta inflamatória associada à alta produção de fatores pró-resolutivos (Alessandri, AP e cols., 2013). A apoptose promove reconhecimento de macrófago, induzindo a eferocitose dessas células, diminuição de fatores pró-inflamatórios e aumento de fatores pró-resolutivos, promovendo a resolução da inflamação.

Um sinal cardinal para o processo de resolução da resposta inflamatória é a eferocitose (Alessandri, AL e cols., 2013). Vimos neste trabalho que a diminuição de neutrófilos na cavidade pleural estava associada à apoptose seguida de eferocitose dessas células por células mononucleares. Além disso, vimos que as células mononucleares mantiveram-se viáveis e não apresentaram diminuição de seu número após o tratamento com PF-04217903. Existe uma grande importância de macrófagos na inflamação, uma vez que a resolução inflamação é muito mais complexa do que a apoptose de leucócitos e inclui a desativação das vias pró-inflamatórias e a eferocitose. Nossos resultados demonstram que a inibição de MET aumenta a taxa de eferocitose de macrófagos. Sendo este um resultado essencial para homeostase do tecido, ou seja, a resolução da inflamação. Os macrófagos classificados como M1

apresentam um fenótipo pró-inflamatório que tem pouca capacidade efecocítica e maior capacidade de fagocitar organismos estranhos. De modo alternativo, os macrófagos classificados como M2 realizam a efecocitose durante a resolução da inflamação e produzem IL-10 e TGF- β , citocinas que têm ações anti-inflamatórias. Posteriormente, os macrófagos se convertem para um perfil de macrófagos resolutivos (Mres), os quais limitam a reparação por fibrose. Isso garante que as células apoptóticas sejam efetivamente removidas do tecido antes da ruptura da membrana, minimizando os danos nos tecidos e a perpetuação da resposta inflamatória, o que induz o reparo e o retorno da homeostase tecidual (Vago, JP e cols., 2016; Alessandri, AL e cols 2013).

No modelo de gota, vimos que a expressão de MET acompanha a cinética de acúmulo de neutrófilos e que sua inibição causa diminuição do número dessas células na cavidade periarticular. Tem sido demonstrado que a expressão de MET é necessária para a migração de neutrófilos durante colite, erupção cutânea ou peritonite (Finisguerra, V e cols., 2015). Outros trabalhos demonstraram o aumento da expressão de MET em ceratocone, que é uma doença inflamatória degenerativa progressiva (You, J e cols., 2015). Além disso, foi demonstrado em um estudo que células dendríticas que exibem o fenótipo ativado, podem promover reações exageradas do sistema imune a uma molécula reconhecida como estranha ao organismo. Já a deficiência de MET nessas células não promove essa reação de “hipersensibilidade”, uma vez que essas células não conseguem atingir os gânglios linfáticos drenantes da pele, mostrando que a sinalização de MET pode ser um determinante crítico para a manutenção da função imune (Baek, JH e cols., 2012). A expressão de MET em neutrófilos tanto de camundongos como de seres humanos é induzido pelo fator de necrose tumoral (TNF) ou por outros estímulos inflamatórios. A ativação do receptor MET pelo seu ligante fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) promove proliferação, migração e sobrevivência celular (Finisguerra, V e cols., 2015). Entretanto, além de MET estar associada à chegada de células ao sítio inflamatório, ela está associada à manutenção dessas células no órgão ou tecido inflamado.

No modelo murino de gota aguda, a inflamação surge da precipitação de ácido úrico na forma de cristais de urato monossódico em forma de agulha. Os cristais de ácido úrico são reconhecidos e fagocitados por células residentes na cavidade articular, promovendo a ativação do complexo proteico citoplasmático inflamassoma, mais especificamente o protótipo NLRP3 (Martinon, F e cols, 2006). Essa ativação promove o recrutamento da proteína ASC, que, por sua vez, atua na ativação da enzima Caspase-1. A Caspase-1 é importante na clivagem, e consequente ativação, da citocina IL-1 β , considerada a principal molécula da inflamação da gota. Uma das principais ações da IL-1 β é a indução da produção de quimiocinas associadas ao recrutamento de neutrófilos, principalmente aquelas que se ligam ao receptor CXCR2. O influxo de neutrófilos durante um ataque agudo de gota é acompanhado por sintomas clínicos de dor (Maueröder, C e cols., 2015). Neste trabalho, avaliamos o efeito do pós-tratamento com o inibidor de MET na hipernocicepção desencadeada pelos cristais de ácido úrico. Observamos que os camundongos que receberam o tratamento com o inibidor PF-04217903 tiveram uma redução da hipernocicepção. Durante a inflamação ocorre a liberação de TNF α , IL-1 os quais induz a ativação de NF- κ B. Esses mediadores estimulam a expressão do receptor MET em neutrófilos que ao se ligar a HGF contribuem para o extravasamento de neutrófilos nos tecidos inflamados. No local inflamado a ativação de MET induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A liberação de citocinas TNF α e citocinas derivadas de queratinócitos (KC) atuam na ativação IL-1 β , o qual ativa prostaglandina, além disso KC atuam através da ativação aminas simpáticas. A ativação aminas simpáticas e prostaglandinas ativam e sensibilizam neurônios nociceptivos promovendo a dor (Finisguerra, V e cols., 2015; Ruiz-Miyazawa, KW e cols., 2015; Cunha, TM e cols, 2005).

Nosso trabalho é o primeiro a relatar o papel pró-resolutivo da inibição farmacológica de MET em um modelo murino de gota, propondo um possível alvo terapêutico para acelerar programas de resolução. Alopurinol e o febuxostate são medicamentos de primeira linha para a prevenção da gota recorrente e agem inibindo a xantina oxidase, que é uma enzima que catalisa a formação de ácido úrico. Esses medicamentos são agentes de primeira linha para prevenir a gota recorrente. Pacientes que recebem medicamentos para

redução de urato devem ser tratados concomitantemente com anti-inflamatórios não esteróides, colchicina ou corticosteróides em baixa dose para prevenir os surtos de gota. O tratamento deve continuar por pelo menos três meses após os níveis de ácido úrico chegar ao desejável. Porém, esses medicamentos podem promover efeitos adversos como: sangramento gástrico, lesão renal, gastrointestinais e alguns deles devem ser evitados por pacientes com insuficiência renal e hepática. Assim, a descoberta de outros fármacos para tratamento de gota ainda é necessária (Hainer, BL e cols., 2014). Um estudo recente demonstrou a importância da proteína pró-resolutiva Anxina A1 (AnxA1) durante a resolução da inflamação no modelo murino de gota. A AnxA1 foi capaz de diminuir o influxo, o acúmulo de neutrófilos na cavidade periarticular e a diminuição da produção de IL-1 β e a hipernocicepção nos animais (Galvão, I e cols., 2017). Essa diminuição de neutrófilos foi devido a indução de apoptose promovida por clivagem de caspases, aumento da acumulação de BAX e fosforilação BAD e supressão das vias de sobrevivência, mecanismos importantes na resolução da artrite gotosa. Além disso, a expressão da AnxA1 atua como um sinal quimioatraente em neutrófilos apoptóticos, aumentando a eferocitose (Galvão, I e cols., 2017). Esses estudos comprovam a grande importância da apoptose e eferocitose durante a resolução da inflamação no modelo murino de gota.

Estudos *in vitro* fornecem informações essenciais que ajudam a compreender como diferentes moléculas intracelulares controlam a sobrevivência de leucócitos em sítios inflamatórios. Contudo, eles não esclarecem toda a complexidade de configurações *in vivo*, que incluem moléculas e vias intracelulares que são inter-relacionados ou co-dependentes (Perez, DA e cols, 2014). No entanto, há uma necessidade de analisar se o organismo humano responde da mesma forma que o organismo animal. Devido a isso, avaliamos o efeito da inibição de MET na apoptose de neutrófilos humanos *in vitro*. Nossos resultados mostraram que o tratamento com inibidor de MET (PF-04217903) e o inibidor de caspase (zVAD-fmk) impediu a apoptose de neutrófilos *in vitro*, evidenciando que o inibidor de MET promoveu a apoptose em neutrófilos humanos por meio da ativação de caspase. Esses dados mostram que PF-04217903 é um possível alvo terapêutico em doenças

inflamatórias aguda humana, como, por exemplo, a gota, alvo de estudo desse trabalho.

6- CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram que a inibição MET em modelos experimentais de inflamação aguda pode antecipar o processo de resolução da inflamação devido ao aumento da taxa de apoptose de neutrófilos e da capacidade eferocítica de macrófagos. PF-04217903 também promoveu a apoptose de neutrófilos no modelo *in vivo* de gota e em neutrófilos humanos *in vitro*. Esses dados evidenciam que PF-04217903 pode representar um possível potencial terapêutico para tratamento de doenças inflamatórias caracterizadas pelo acúmulo de neutrófilos.

7- PERSPECTIVAS

- 1- Avaliar a apoptose bioquímica de neutrófilos do lavado periarticular de camundongos tratados com PF-04217903 e a expressão do receptor MET no modelo de pleurisia induzida por LPS.
- 2- Quantificar HGF presente do lavado pleural.
- 3- Avaliar os mecanismos envolvidos na apoptose induzida por PF-04217903 nos modelos murino de pleurisia e gota.
- 4- Avaliar se presença de HGF promove maior período sobrevivência de neutrófilos humano em cultura quando comparado com o grupo controle (*in vitro*).
- 5- Avaliar a eferocitose de neutrófilos humanos (*in vitro*), após o tratamento com PF-04217903 (Neutrófilo humanos apoptóticos em co-cultura com linhagem de monócitos).
- 6- Avaliar os mecanismos envolvidos na apoptose induzida por PF-04217903 em neutrófilos humanos.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessandri AL, Sousa LP, Lucas CD, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM (2013) Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & therapeutics* **139**: 189-212

Ankarcrona Maria, Dypbukt Jeannette M., Bonfoco Emanuela, Zhivotovsky Boris, Orrenius Sten, Lipton Stuart A., and Nicotera Pierluigi (1995) .Glutamate-Induced Neuronal Death: A Succession of Necrosis or Apoptosis Depending on Mitochondrial Function. *Neuron*, **Vol. 15**, 961-973.

Basil M C. and Levy B D. (2016). Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **16**(1): 51–67.

Bannenberg GL., Chiang Nan, Ariel Amiram, Arita Makoto, Tjonahen Eric, Gotlinger Katherine H., Hong Song and Serhan Charles N. (2005). Molecular Circuits of Resolution: Formation and Actions of Resolvins and Protectins *J Immunol* **174**(7) 4345-4355;

Baek Jea-Hyun, Birchmeier Carmen, Zenke Martin and Hieronymus Thomas. (2012) The HGF Receptor/Met Tyrosine Kinase is a Key Regulator of Dendritic Cell Migration in Skin Immunity. *J Immunol* **189**:1699-1707

Birchmeier Carmen, Birchmeier Walter, Gherardi Ermanno, F.Vande Woude George.(2003) Met, metastasis, motility and more. *Nature reviews- Molecular cell biology* **4**: 915-25

Busso Nathalie and So* Alexander. (2010) Mechanisms of inflammation in gout. *Arthritis Research & Therapy* **12**:206.

Cunha TM , Verri WA Jr , Silva JS , Poole S , Cunha FQ , Ferreira SH (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings the National Academy Sciences USA*. **102**(5): 1755–1760.

Faria Claudia, Smith Christian and Rutka James. (2011)The Role of HGF/c-Met Pathway Signaling in Human Medulloblastoma. *Molecular Targets of CNS Tumors* **30**: 642-660

Francischetti Ieda, Bitu Moreno José, Scholz Martin, Yoshida Winston Bonetti. (2010) Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. *Revista Brasileira de cirurgia cardiovascular* **25**(4): 575-584.

Finisguerra Veronica, Conza Giusy Di, Matteo Mario Di, Serneels Jens, Costa Sandra, Thompson A. A. Roger, Wauters Els, Walmsley Sarah, Prenen Hans, Granot Zvi, Casazza Andrea, Mazzone Massimiliano (2015) MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Europe PMC Funders Group* **522**: 349-53

Fullerton, James N. and Gilroy Derek W.(2016) Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews | Drug discovery* **Doi:10.1038/nrd.2016.39**.

Galvão Izabela, Dias Ana Carolina Fialho, Tavares Livia Duarte, Rodrigues ,* Celso Martins Queiroz-Junior, Costa Vivian Vasconcelos, Reis Alesandra Corte, Oliveira Rene Donizeti Ribeiro, Louzada-Junior Paulo, Souza Daniele Glória, Leng Lin, Bucala Richard, Sousa Lirlândia Pire, Bozza Marcelo Torres, Teixeira Mauro Martins, Amaral Flávio Almeida. (2016) Macrophage migration inhibitory factor drives neutrophil accumulation by facilitating IL-1 β production in a murine model of acute gout. *J Leukoc Biol.* Jun; **99**(6): 1035–1043.

Garajová Ingrid, Giovannetti Elisa, Biasco Guido and Peters Godefridus J. (2015) c-Met as a Target for Personalized Therapy. *Translational Oncogenomics* 2015:7(S1) 13–31 **Doi: 10.4137/TOGOG.S30534**.

GH Xiao, M Jeffers, A Bellacosa, Y Mitsuuchi, Woude GF Vande, JR Testa. (2001) Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 247–252.

Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* **3**: 401-416

Ghaemi-Oskouie Faranak and Shi Yan (2011). The Role of Uric Acid as an Endogenous Danger Signal in Immunity and Inflammation. *Curr Rheumatol* **13**(2): 160–166.

Grivicich I, Regner A, Brondani A R (2007). Apoptose: Programa de morte celular. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; **53**(3): 335-343

Hallett JM, Leitch AE, Riley NA, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2008) Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends in pharmacological sciences* **29**: 250-257

Hainer Barry L., Matheson Eric and Wilkes R. Travis. (2014) Diagnosis, Treatment, and Prevention of Gout. *American family physician* **90**: 830-836.

Jiang Chunling, Liu Zheng, Hu Rong, Bo Lulong, Minshall Richard D., Malik Asrar B. and Hu Guochang. (2017) Inactivation of Rab11a GTPase in Macrophages Facilitates Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils *J Immunol*; **198**:1660-1672

Lawrence T, Gilroy DW (2007) Chronic inflammation: a failure of resolution? *International journal of experimental pathology* **88**: 85-94

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology* **7**: 678-689

Manso Carlos (1986). Oncogenes. *Acta médica portuguesa* **7**: 171-176

Martinon F1, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **9;440**(7081):237-41.

McCubrey James A., Steelman Linda S., Chappell William H. , Abrams Stephen L., Wong Ellis W.T., Chang Fumin , Lehmann Brian, Terrian David M., Milella Michele, Tafuri Agostino, Stivala Franca, Libra Massimo, Basecke Jorg, Evangelisti Camilla, Martelli Alberto M., Franklin Richard A. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* **1773**: 1263–1284.

Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**: 428-435

Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**: 771-7

Muimo Richmond. (2017) Classical activation of macrophages and vardenafil *Clinical Science* **131** (11) 1141-1145

Ortega-Gómez Almudena, Perretti Mauro, Soehnlein Oliver (2013) Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* **5**: 661–674.

Ozfiliz Pelin, Kizilboga Tugba , Demir Salih , Alkurt Gizem , Palavan-Unsal Narçin, Damla Arisan Elif, Dinler-Doganay Gizem. (2015) Bag-1 promotes cell survival through c-Myc-mediated ODC upregulation that is not preferred under apoptotic stimuli in MCF-7 cells. *Cell biochemistry and function* **33**: 293–307.

Pelengaris Stella , Khan Mike, Evan Gerard. (2002) C-myc: more than just a matter of life and death. *Nature reviews - Cancer* **2**: 764-76.

Pereira, R.R (2006). Estudo do efeito antiinflamatório do tacrolimus no modelo de pleurisia em camundongos. Dissertação (Mestrado em ciências médicas). Universidade Federal de Santa Catarina.

Perez DA, Vago JP, Athayde RM, Reis AC, Teixeira MM, Sousa LP, Pinho V (2014) Switching off key signaling survival molecules to switch on the resolution of inflammation. *Mediators of inflammation* **2014**: 829851

Perretti Mauro, Leroy Xavier, Bland Elliot J, Montero-Melendez Trinidad. (2015) Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. DOI: 10.1016/j.tips.

Prince, L. R.; Whyte, M. K.; Sabroe, I.; Parker, L. C. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr.Opin.Pharmacol.*, v. **11**, n. 4, p. 397-403, 2011a

Ruiz-Miyazawa Kenji W., Pinho-Ribeiro Felipe A., Zarpelon Ana C. Staurengo-Ferrari Larissa, Silva , Alves-Filho Jose C, Cunha Thiago M., Cunha Fernando Q, Casagrande Rubia, Jr. Waldiceu A. Verri. (2015) Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF- κ B *Chemico-Biological Interactions* **237** 9–17

Rossi AG, Sawatzky DA, Walker A, C Ward C, Sheldrake TA, Riley NA, Caldicott A, AMartinez-Losa A, Walker TR, Duffin R, Gray M, Crescenzi E, Martin MC, Brady HJ, Savill JS, Dransfield I, Haslett C (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nature Medicine* **12**: 1056 - 1064.

Russo R. C., Garcia C. C., Barcelos L. S., Rachid M. A., Guabiraba R., Roffe E., Souza A. L. S., Sousa L. P., Mirolo M., Doni A., Cassali G. D., Pinho V., Locati M., Teixeira M. M. (2010). Phosphoinositide 3-kinase plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *Journal of Leukocyte Biology* DOI: 10.1189/jlb.0610346

Sanz M.J. and Kubes P. (2012). Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur. J. Immunol* **42**: 278–283

Serhan CN (2010) Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *The American journal of pathology* **177**: 1576-1591

Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**: 325-332

Serhan CN, Chiang N, Dalli J (2015) The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in immunology* **27**: 200-215

Serhan*, Charles N., Chiang* Nan, and Dyke#, Thomas E. Van (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and proresolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8(5)**: 349–361.

Sousa LP, Alessandri AL, Pinho V, Teixeira MM (2013) Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Current opinion in pharmacology* **13**: 625-631

Sousa LP, Lopes F, Silva DM, Tavares LP, Vieira AT, Rezende BM, Carmo AF, Russo RC, Garcia CC, Bonjardim CA, Alessandri AL, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM. (2010) PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *Journal of leukocyte biology* **87**: 895-904.

Talvani A, Coutinho SF, Barcelos Lda S, Teixeira MM. (2009) Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with Trypanosoma cruzi GPI-mucins. *Parasitology Research* Volume **104**, pp 1141–1148.

Teng Tie-Shan, Ji Ai-ling, Ji Xin-Ying, Li Yan-Zhang. (2017) Action to Being Conquered. *Journal of Immunology* **ID** 9671604, 14

Thatte U, Dahanukar S. (1997). Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* **54(4)**: 511-32.

Vago Juliana P., Tavares Luciana P., Sugimoto Michelle A., Lima Grazielle Letícia N., Galvão Izabela, Caux Thais R. de, Lima Kátia M., Ribeiro Ana Luíza C., Carneiro Fernanda S., Nunes Fernanda Freire C., Pinho Vanessa, Perretti Mauro, Teixeira Mauro M. and Sousa. Lirlândia P. (2016) Proresolving Actions of Synthetic and Natural Protease Inhibitors Are Mediated by Annexin A1. *The Journal of Immunology* **Doi**:10.4049

Videira Renato Sader, Deboni Maria Cristina Zindel, Souza Cíntia Alferes de, Okamoto Ana Cláudia, Melhad Ronaldo Maia (2002). Oncogenes e Desenvolvimento do Câncer. *Arquivo de ciências e saúde UNIPAR* **DOI**: <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v6i1.2002.1155>

Warren Eric, Teskey Garrett, Venketaraman Vishwanath. (2017) Effector Mechanisms of Neutrophils within the Innate Immune System in Response to Mycobacterium tuberculosis Infection. *Journal of Clinical Medicine* **Doi**:10.3390

Wyllie AH. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis
Cell death in biology and pathology pp 9-34

Yamazaki Shinji, Skaptason Judith, Romero David, Vekich Sylvia, Jones Hannah M.,

Tan Weiwei, Wilner Keith D., and Koudriakova Tatiana. (2011) Prediction of Oral Pharmacokinetics of cMet Kinase Inhibitors in Humans: Physiologically Based Pharmacokinetic Model Versus Traditional One-Compartment Model. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* **39**:383–393.

You Jingjing, Wen Li, Roufas Athena, Hodge Chris, Sutton Gerard, and Madigan Michele C. (2015) Expression of HGF and c-Met Proteins in Human Keratoconus *Corneas Journal of Ophthalmology* Article ID 852986.

Zhang Xiao-Yong, Pfeiffer Harla K., Mellert Hestia S., J. Stanek Timothy, Sussman Robyn T., Kumari Alpana, Yu Duonan, Rigoutsos Isidore, Thomas-Tikhonenko Andrei, Seidel Hans E., Chodosh Lewis A., Packham Graham, Baserga Renato, McMahon Steven B. (2011) Inhibition of the Single Downstream Target BAG1 Activates the Latent Apoptotic Potential of MYC. *Molecular and cellular biology* **31**: 5037–5045.

Zhou Dong, Tan Roderick J., Lin Lin, Zhou Lili and Liu Youhua. (2013) Activation of hepatocyte growth factor receptor, c-met, in renal tubules is required for renoprotection after acute kidney injury *Kidney Int.* **84(3)**: 509–520.

Zou Helen Y., Li Qihua, Lee1 Joseph H, Arango Maria E., Burgess Kristina , Qiu Ming, Engstrom Lars D., Yamazaki Shinji, Parker Max, Timofeevski Sergei, Cui1 Jingrong Jean, McTigue Michele, Los Gerrit, Bender Steven L., Smeal Tod, and Christensen James G.. (2012) Sensitivity of Selected Human Tumor Models to PF-04217903, a Novel Selective c-Met Kinase Inhibitor *Molecular cancer therapeutics* DOI: 10.1158/1535-7163