

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**ESTUDO DA PROTEÍNA SURVIVINA NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO
E NA SOBREVIVÊNCIA DE NEUTRÓFILOS**

Jéssica Rayssa Machado

Belo Horizonte – MG

Novembro de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Jéssica Rayssa Machado

**ESTUDO DA PROTEÍNA SURVIVINA NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO
E NA SOBREVIVÊNCIA DE NEUTRÓFILOS**

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 de Mestre em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva

Belo Horizonte

Novembro de 2018

Ensino

“Minha mãe achava estudo

a coisa mais fina do mundo.

Não é.

A coisa mais fina do mundo é o sentimento.

Aquele dia de noite, o pai fazendo serão,

ela falou comigo:

“Coitado, até essa hora no serviço pesado”.

Arrumou pão e café, deixou tacho no fogo com água quente.

Não me falou em amor.

Essa palavra de luxo.”

Adélia Prado

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo amparo emocional durante toda minha caminhada, à minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio e incentivo. Amo vocês! À minha mãe que, além de ser da família, sempre foi minha melhor amiga e que com muito carinho e sábios conselhos tem me ensinado a viver. Aos meus irmão e amigos, Daniel e Daniella, e à minha sobrinha Gabriela, pelo companheirismo, pelas risadas e pelos conselhos.

Aos amigos do LACBM da UFSJ, que aprendemos juntos um pouquinho sobre fazer ciência e especialmente ao professor Luciano Rivaroli pela orientação acadêmica e pela amizade.

A todos os professores que me apoiaram, desde os anos iniciais, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao Larri (UFMG) pela colaboração e ajuda, especialmente ao Walyson, a Anna e a Júlia, pela amizade. Aos amigos que conheci em BH, pessoal da “casinha” e meus colegas do Anita que fizeram os meus dias mais leves. A minha amiga maravilhosa Teresiana, que Deus colocou em minha vida e que sempre esteve do meu lado, e aos amigos de Dores de Campos pela torcida!

Aos colegas do Imunofar pelo tempo, atenção e colaboração e à minha orientadora Vanessa Pinho pela compreensão e aprendizado. Aos professores da UFMG pela transmissão e discussão de conhecimentos.

As agências que contribuíram financeiramente para realização deste projeto: CAPES, CNPq, e FAPEMIG.

E por fim, a todos que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Inflamação	1
1.2. Processo Inflamatório Agudo	1
Modelos experimentais de Inflamação Aguda	4
1.3. Resolução Da Inflamação	5
1.3.1. Remoção do estímulo inflamatório:.....	5
1.3.2. Inibição do recrutamento leucocitário.....	5
1.3.3. Produção de mediadores pró-resolutivos:.....	6
1.3.4. Indução de apoptose celular	7
1.3.5. Eferocitose.....	9
1.4. Homeostasia Tecidual	12
1.5. Terapias Pró-Resolutivas	13
1.6. Proteínas Inibidoras De Apoptose.....	15
1.6.1 Survivina	16
1.6.2. Survivina e processos imunes.....	18
1.6.3. Antagonistas de survivina	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral:	21

2.2.	Objetivos Específicos	21
3.	METODOLOGIA.....	22
3.1.	Animais experimentais	22
3.2.	Estudo da survivina em modelo de pleurisia induzida por LPS.....	22
3.2.1.	Cinética inflamatória da survivina	22
3.2.2.	Terapia farmacológica	23
3.2.3.	Caracterização de células inflamatórias em pleurisia	24
3.2.4.	Análise morfológica de apoptose e de eferocitose.....	24
3.3.	Estudo da survivina em modelo de gota	24
3.3.1.	Avaliação de hipernocicepção em modelo de gota	24
3.4.	Estudo da survivina em neutrófilos humanos estimulados <i>in vitro</i> com LPS.....	25
3.4.1.	Isolamento de neutrófilos	25
3.4.2.	Tratamento com YM155.....	25
3.4.3.	Análise bioquímica de apoptose	26
3.4.4.	Análise de sobrevivência de neutrófilos com survivina recombinante	26
3.4.	Análises estatísticas.....	26
4.	RESULTADOS.....	27
4.1.	Estudo do papel da survivina na manutenção da resposta inflamatória no modelo de pleurisia induzida por LPS em murinos.....	27

<i>i. Administração de LPS altera a expressão de survivina na cavidade pleural</i>	27
<i>ii. Survivina é expressa em neutrófilos (LY6G) e macrófagos (F4/80) durante uma resposta inflamatória aguda induzida por LPS.</i>	29
<i>iii. Survivina contribui para a sobrevivência de células inflamatórias durante uma resposta inflamatória aguda.</i>	32
4.2. Estudo da survivina em inflamação induzida por MSU	38
4.3. Análises <i>in vitro</i> : Cultura de neutrófilos humanos	41
<i>i. YM155 induz apoptose em neutrófilos humanos</i>	41
<i>ii. Survivina exógena não prolonga a sobrevivência de neutrófilos</i>	43
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	48
7. PERSPECTIVAS	49
8. REFERÊNCIAS	50

RESUMO

A inflamação aguda é o mecanismo fundamental pelo qual os organismos multicelulares lidam com lesões causadas por insultos relacionados ou não relacionados à infecção. Durante a inflamação aguda, os neutrófilos circulantes são os primeiros leucócitos a atingir o local inflamado e têm sido considerados como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra estímulos nocivos. Em geral, após os neutrófilos desempenharem seu papel no sítio inflamatório, eles são removidos dos tecidos por apoptose e subsequente fagocitose por macrófagos. Assim, a inflamação deve ser um processo altamente controlado para culminar em sua resolução e retorno da homeostase tecidual. A inflamação descontrolada ou não resolvida pode estar associada ao aumento da sobrevivência de neutrófilos e à resposta inflamatória prolongada, culminando em doenças crônicas. O contato de neutrófilos com células de tecidos residentes e mediadores inflamatórios resulta na ativação de neutrófilos e no aumento da longevidade dessas células. Este processo é mediado por moléculas anti-apoptóticas e reguladores de moléculas pró-apoptóticas. A survivina é um componente da família das Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs) e tem seu papel extensivamente estudado em células com alto potencial proliferativo e viabilidade, incluindo células cancerígenas. Recentemente, alguns estudos demonstraram sua participação no desenvolvimento de doenças autoimunes, mas sua expressão e função em células do sistema imune e a manutenção da resposta inflamatória são desconhecidas. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a expressão e função da survivina no processo inflamatório agudo induzido por LPS e na sobrevivência de neutrófilos.

ABSTRACT

Acute Inflammation is the fundamental mechanism by which multicellular organisms deal with injury caused either by infectious or non-infectious insults. During the acute inflammation, circulating neutrophils are the first leukocytes to reach the inflamed site, and have been regarded as first line of host defense against noxious stimulus. In general, after neutrophils play their role in inflammatory site, they are removed from tissues by apoptosis and subsequent phagocytosis by macrophage. Thus, inflammation must be a highly controlled process in order to culminate in its resolution and return of tissue homeostasis. Uncontrolled or unresolved inflammation can be associated to increased neutrophil survival and prolonged inflammatory response culminating in chronic diseases. The contact of neutrophils with resident tissue cells and inflammatory mediators results in the activation of neutrophils and increased lifespan of these cells. This process is mediated by anti-apoptotic molecules and regulators of pro-apoptotic molecules. Survivin is a component of the Apoptosis Inhibitory Proteins family (IAPs) family and has its role extensively studied in cells with high proliferative potential and viability, including cancer cells. Recently, some studies have demonstrated their participation in the development of autoimmune diseases, but their expression and function in cells of the immune system and maintenance of inflammatory response is unknown. Thus, the objective of this work was to study the expression and function of survivin in the acute inflammatory process induced by LPS and to neutrophil survival.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação é um fenômeno fisiológico de proteção do organismo contra condições nocivas, como infecções e lesão tecidual, e tem como fim eliminar os estímulos prejudiciais, promover a reparação e cura do tecido e estabelecer, no caso de infecção, uma memória imune (Medzhitov, 2008; Fullerton e Gilroy, 2016; Withers, 1992). Esse fenômeno é orquestrado temporalmente através da interação entre células imunológicas e estruturais e da produção de mediadores químicos que neutralizam estímulos, como produtos microbianos (lipopolissacarídeos – LPS, ácido lipoteicóico, flagelina) ou moléculas endógenas que afetam a homeostase tecidual (Gilroy e Maeyer, 2015; Alessandri *et al.*, 2013).

O processo inflamatório é classificado em processo agudo e crônico baseado na resposta celular, nos mediadores químicos envolvidos e na duração da resposta inflamatória. A inflamação aguda se estabelece em um estágio inicial, em resposta à lesão ou infecção e visa processos como a eliminação do estímulo inflamatório, a resolução da inflamação e o retorno à homeostase tecidual. Em casos onde ocorram alterações moleculares ou fisiológicas que interfiram nos mecanismos normais desses processos, a resolução da inflamação pode ser afetada e um perfil inflamatório duradouro, ou crônico, e patológico pode se desenvolver gerando doenças como a asma, aterosclerose, artrite reumatóide, gota, entre outras (Kotas e Medzhitov, 2015; Leliefeld *et al.*, 2016; Gilroy e Maeyer, 2015; Alessandri *et al.*, 2013).

1.2. Processo Inflamatório Agudo

Um processo inflamatório agudo é desencadeado após ocorrer uma infecção ou uma lesão tecidual. Inicialmente, ocorre uma resposta vascular resultando em um aumento da permeabilidade de vasos e vasodilatação. Por meio desta, há um aumento do fluxo sanguíneo local, resultando em hiperemia, processo que consiste em alterações do endotélio vascular, contribuindo para a exsudação de proteínas e fluido sanguíneo para dentro do tecido e para o local inflamado (Crecelius *et al.*, 2014; Perretti, 1996). Além disso, algumas células sanguíneas como leucócitos circulantes são recrutadas para o tecido por um processo conhecido como diapedese, o qual será descrito em detalhes abaixo.

A diapedese inicia-se com o recrutamento de leucócitos presentes na circulação sanguínea, entre estes, os neutrófilos, que são os primeiros leucócitos a desempenharem um papel na resposta imune inata. Essas células são derivadas da medula óssea e são liberadas em um estágio final de maturação na circulação sanguínea. Nos seres humanos, cerca de 100 bilhões de neutrófilos entram e deixam a circulação todos os dias, número que representa o papel fundamental dessas células para um processo inflamatório (Teng *et al.*, 2017). A migração para o tecido ocorre em resposta a quimioatraentes, descritos mais adiante, e é coordenada pela interação entre os leucócitos com células endoteliais e a matriz extracelular (Dean *et al.*, 2008; Ortega-Gómez, *et al.*, 2013).

Os neutrófilos presentes na circulação sanguínea aderem-se às células endoteliais ativadas presentes em vênulas pós-capilares por meio de seus ligantes glicosilados, como a interação entre a glicoproteína ligante de P-selectina (PSGL-1) com as P e E-selectinas endoteliais. Essa adesão é uma interação fraca e transitória que reduz o movimento de neutrófilos ao longo do vaso, gerando um processo conhecido como **rolamento**. Além disso, essa interação contribui para a ativação dos neutrófilos por mediadores químicos presentes na superfície luminal do endotélio, que contribuem para o aumento de expressão e afinidade de integrinas (Fullerton e Gilroy, 2016; Alessandri *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013; Nourshargh e Voisin, 2013). Estas últimas, por sua vez, ligam-se às moléculas de adesão Intercelular 1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1* - ICAM-1) e moléculas de adesão vascular 1 (do inglês, *vascular cell adhesion molecule 1* - VCAM-1) na superfície do endotélio, interrompendo o processo de rolamento e promovendo, então, uma adesão altamente forte, capaz de cessar o movimento dos neutrófilos.– **Figura 1** (Burne *et al.*, 2001; Phillipson *et al.*, 2006). Após a parada celular, mediada pelas integrinas de alta afinidade, diferentes vias de sinalização são ativadas e as células iniciam a **transmigração** (McDonald e Kubes, 2012). Esse fenômeno consiste na polarização de neutrófilos firmemente aderidos, que penetram através do endotélio em direção ao estímulo inflamatório por rotas transjuncional ou transcelular (Phillipson *et al.*, 2006; Nourshargh e Voisin, 2013). Parte do processo pode ser observada na **Figura 1**.

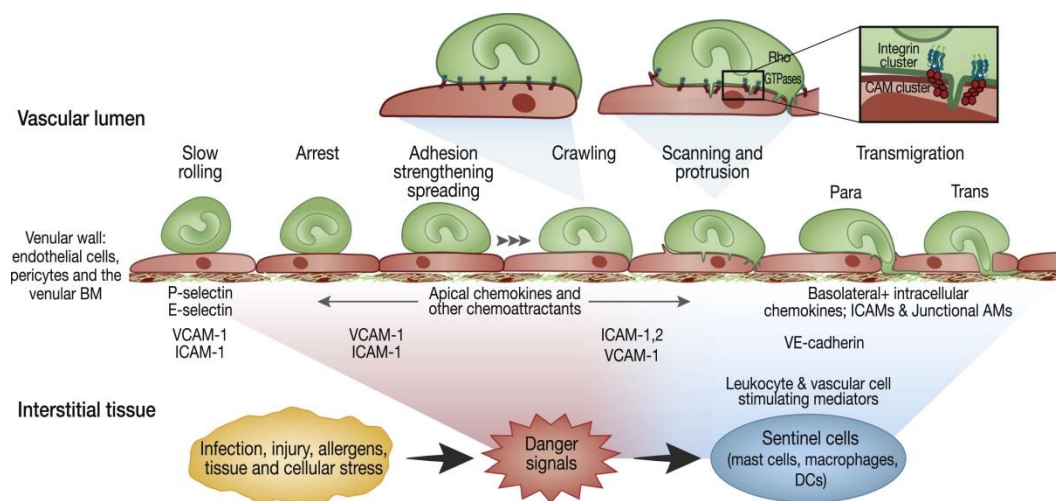


Figura 1. Extravasamento de leucócitos para o tecido. O processo é controlado por interações adesivas entre leucócitos e células endoteliais (Nourshargh e Alon, 2014).

Uma vez dentro dos tecidos, os neutrófilos migram para o local de inflamação direcionados por um gradiente de moléculas quimiotáticas. Os quimioatraentes podem ser lipídios, peptídios, peptídeos N-formilados, anafilotoxinas do sistema complemento ou quimiocinas que agem como “pistas” moleculares para atrair os leucócitos para os locais de inflamação (Pinho et al., 2007; Petri e Sanz, 2018; Allendorf et al., 2005). Eles podem ter origem de células do hospedeiro, tais como as quimiocinas interleucina-8 (IL-8), o CXCL1, CXCL-6 e o peróxido de hidrogênio, ou ainda, serem produtos dos próprios agentes de infecção, como os lipopolissacarídeos (LPS), o ácido lipoteicóico e os peptídeos N-formilados (fMLP). Essas substâncias são capazes de desempenharem seu papel através da interação com receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) expostos na superfície celular de neutrófilos. Uma vez que o quimioatraente liga-se aos receptores, uma via de sinalização é ativada e a célula assume um rearranjo do citoesqueleto capaz de fazê-la emitir pseudópodes e movimentar-se intra ou extravascularmente a favor de um gradiente de concentração da quimiocina (Pinho et al., 2007; Hirsch et al., 2000; Li et al., 2000; Petri e Sanz, 2018).

Além disso, algumas citocinas como a interleucina-6 (IL-6), a IL-8 e o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), liberados no local da injúria, podem exercer outros papéis, como induzir um aumento da sobrevivência de leucócitos (Petri e Sanz, 2017; Alessandri et al., 2013; Medzhitov, 2008; Fullerton e Gilroy, 2016). Esses dois eventos supracitados, em conjunto, contribuem para a ação dos neutrófilos em eliminar o estímulo inflamatório (Alessandri et al., 2013).

Por fim, a resposta inflamatória aguda é normalmente terminada quando o insulto é removido e o tecido danificado é reparado. Contudo, esse término do processo inflamatório não ocorre de forma passiva e a transição para o estado homeostático é um processo ativo e altamente regulado, conhecido como a resolução da inflamação, que será descrita adiante (Alessandri *et al.*, 2013, Medzhitov, 2008; Fullerton e Gilroy, 2016).

Modelos experimentais de Inflamação Aguda

No decorrer do século 20, cientistas de todo o mundo tem se envolvido em pesquisas para a descoberta de tratamentos para doenças imunes, usando técnicas provenientes de institutos de pesquisa e universidades. Isso levou a farmacologistas e imunologistas a desenvolverem abordagens adequadas em espécies animais para testes de novas terapias em humanos. A ordem dos roedores, que compreendem principalmente ratos e camundongos, são os animais mais utilizados na pesquisa, parte por razões históricas, mas também devido aos custos de manutenção, facilidade de manejo e capacidade de manipular suas células e tecidos para desenvolverem modelos que se assemelham a doenças humanas. Dentre essas doenças, no campo da imunologia, temos o modelo de artrite reumatoide, esclerose múltipla, asma alérgica e colite, por exemplo (Webb, 2014). Nesse trabalho o modelo de doença utilizado para o estudo da sobrevivência será a gota e para o estudo da inflamação, em um contexto geral, será a pleurisia aguda induzida por LPS.

A gota é uma doença inflamatória mais comum em homens com mais de 40 anos, com incidência de 1,4 em mulheres e de 4 homens a cada 1.000 pessoas/ano. Essa doença consiste em uma hiperuricemia resultante da saturação de cristais de ácido úrico (do inglês, *monosodium urate* - MSU) no sangue ou líquido sinovial, com formação de cristais que se depositam nas articulações e nos rins (Amaral *et al.*, 2012; Mitroulis *et al.*, 2013). Nosso grupo desenvolve o modelo de gota em murinos, segundo Amaral *et al.*, 2012, por meio da aplicação de cristais de MSU (100µg) na cavidade intrarticular de joelho.

O modelo murino de pleurisia induzida por LPS já foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa, como descrito por Sousa *et al.*, 2010. Nesse modelo os camundongos recebem 100µl de LPS (250 ng/ml) na cavidade intrapleural, na qual ocorre o acúmulo de células inflamatórias, suficientes para dirigir nossos estudos. Vale ressaltar que esse modelo não representa uma doença, visto que a pleurisia não acomete humanos, nem roedores em situações naturais, mas é uma técnica capaz de fornecer um grande número de amostras de

células inflamatórias estimuladas, que contribui para a agilidade e fornecimento de materiais para estudos.

1.3. Resolução Da Inflamação

A resolução da inflamação é um processo ativo e extremamente importante para o controle da inflamação que envolve o término da resposta inflamatória, a produção de mediadores pró-resolutivo e a ativação de vias de sinalização que controlam as seguintes etapas:

1.3.1. Remoção do estímulo inflamatório:

Para a resolução ocorrer de forma efetiva é imprescindível que o agente inflamatório seja removido, como por exemplo, em infecções bacterianas, em que a remoção do patógeno é facilitada pela ação da NADPH oxidase de polimorfonucleares (PMN) (Segal *et al.*, 1981; Impellizzeri *et al.*, 2011). Por outro lado, em doenças autoimunes, como artrite reumatóide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico, a remoção do estímulo inflamatório é particularmente relevante, uma vez essas doenças são dirigidas por antígenos endógenos (Gilroy e Fullerton, 2016).

1.3.2. Inibição do recrutamento leucocitário

Como descrito anteriormente, os neutrófilos são capazes de migrar rapidamente e em grande número em direção ao agente inflamatório. O recrutamento é orquestrado por quimioatraentes, que compreendem um grupo químico diversificado de “pistas” de orientação molecular (Petri e Sanz, 2018). Durante a resolução da inflamação esse recrutamento de neutrófilos é reduzido por diferentes mecanismos. Por exemplo, alguns quimioatraentes em altas concentrações podem promover dessensibilização, internalização ou “dowregulation” de receptores quimiotáticos (Headland e Norling, 2015). A produção de mediadores pró-resolutivos tais como anexina A1, resolvinas, protectinas e maresinas podem inibir a migração de neutrófilos (Headland e Norling, 2015; Serhan *et al.*, 2006). A anexina A1 (AnxA1), uma proteína regulada por glicocorticóides com funções anti-inflamatórias e pró-resolutivas, reduz o recrutamento através da interação com os receptores da família peptídeos formilados, FPR1 e FPR2/ALX (Gastardelo *et al.*, 2009; Galvão *et al.*, 2017). As resolvinas, por sua vez, inibem o recrutamento de neutrófilos pela interação com o receptor acoplado a proteína G – 32 (GPR32) (Norling *et al.*, 2012).

A ligação de quimiocinas aos receptores atípicos de quimiocinas ACKR, também compreende um mecanismo inibidor de recrutamento. Os ACKR não são capazes de ativar as vias clássicas de sinalização dependentes de proteínas G quando se ligam a quimiocinas e, desta forma, inibem a migração celular. Além disso, os ACKRs medeiam internalização ou proteólise de quimiocinas, afetando a disponibilidade das mesmas e contribuindo para inibir a migração (Nibbs e Graham, 2013; Werth e Forster, 2016). A proteólise de quimiocinas também ocorre da clivagem pela metoproteínase-12 (MMPS-12), produzida por macrófagos presentes no tecido, como demonstrado por Dean e colaboradores (2008).

1.3.3. Produção de mediadores pró-resolutivos:

Durante uma resposta inflamatória diversos mediadores e de diferentes naturezas químicas (lipídicos, peptídicos, purinas, gases e neuromediadores) são produzidos. Os mediadores lipídicos são produzidos através da ação das enzimas ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenases (LO) sobre o ácido araquidônico (AA). Os eicosanoicos (prostaglandinas e leucotrienos), produtos da ação dessas enzimas, são pró-inflamatórios e tem importante papel no recrutamento de leucócitos, nas mudanças do fluxo sanguíneo e no aumento da permeabilidade de vasos sanguíneos (Sugimoto *et al.*, 2016). Os mediadores lipídicos também são capazes de induzir a produção de mediadores pró-resolutivos no sítio inflamatório. Levy e colaboradores (2001), por exemplo, conseguiram demonstrar que os PMNs expostos a altas concentrações de prostaglandinas E2 (PGE₂) e prostaglandinas D2 (PGD₂) aumentam a produção de 15-lipoxigenase (15-LO). Esta, por sua vez, atua indiretamente na produção de lipoxina, um dos mais importantes, ou mais bem descritos, mediador pró-resolutivo.

As lipoxinas (LX), juntamente com outros mediadores como as resolvinas, protectinas e maresinas, compõem a superfamília de mediadores pró-resolutivos especializados (SPM, do inglês: *specialized pro-resolving mediators*). Estudos recentes demonstram a ação desses mediadores em diversos modelos de doenças crônicas como a colite, a artrite reumatoide e o diabetes. Em geral, esses mediadores podem ativar eventos importantes para a resolução como, a cessação da infiltração de leucócitos efetores, a regulação dos níveis de quimiocinas e citocinas, o desligamento das vias de sinalização associadas com a sobrevivência de leucócitos, a indução da eferocitose de neutrófilos apoptóticos, a reprogramação de macrófagos e a estimulação de mediadores anti-inflamatórios (El Kebir *et al.*, 2012; Dalli e Serhan, 2017;

Werz *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2018). Alguns desses eventos serão descritos em detalhes adiante.

Os mediadores de natureza proteica incluem a anexina A1 (ANEXA1), a melanocortina, quemerina, e galectinas. A ANEXA1, além de sua ação na inibição do recrutamento leucocitária anteriormente descrita, ela induz a apoptose de leucócitos (Vago *et al.*, 2012; Sugimoto *et al.*, 2017; Debret *et al.*, 2003; Galvão *et al.*, 2017), estimula a eferocitose (Galvão *et al.*, 2017; Scannell *et al.*, 2007) e induz a reprogramação de macrófagos (Li *et al.*, 2011; Cooray *et al.*, 2013). A melanocortina, por sua vez, é encontrada principalmente no sistema nervoso central, mas em menores quantidades são produzidas em outras regiões como pele, baço e pulmões e contribui para a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-8, IL-6, TNF- α , IFN- γ , e IL-17 e para a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (Taylor *et al.*, 1994; Delgado *et al.*, 1998; Kaneva *et al.*, 2012). As quemerinas promovem a eferocitose de células apoptóticas, inibem a ativação de integrinas, reduzindo a adesão de neutrófilos e quimiotaxia (Mariani e Roncucci, 2015; Cash *et al.*, 2010; Cash *et al.*, 2013). Por fim, as galectinas como a galectina-1 e 9 (Gal-1 e Gal-9), inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, a adesão e o tráfico de leucócitos (Rabinovich *et al.*, 1999; Norling *et al.*, 2008; Niki *et al.*, 2009).

Os mediadores gasosos são compostos por gases de baixos pesos moleculares, como o sulfeto de hidrogênio (H₂S), o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO). A produção desses gases está relacionada a processos fisiológicos e patológicos. No contexto de resolução da inflamação, eles apresentam ações semelhantes, como proteção de células e tecidos, a estimulação de angiogênese e a indução de apoptose celular, contribuindo para a rescisão da resposta inflamatória (Gonçalves *et al.*, 2018).

1.3.4. Indução de apoptose celular

A inibição do recrutamento de neutrófilos não é o único passo requerido para reconstituir a homeostase tecidual após eliminação da resposta inflamatória. O *clearance* de leucócitos também é um evento fundamental para a resolução da inflamação. As células inflamatórias podem ser eliminadas do sítio inflamatório por recirculação sistêmica, drenagem linfática ou por morte celular. Os leucócitos podem sofrer diferentes tipos de morte celular como, autofagia, NET-osis e necrose durante o processo inflamatório. Entretanto, para que a resolução ocorra, a depuração de granulócitos deve ocorrer, principalmente, por apoptose. As

células apoptóticas são capazes de reduzir os sinais inflamatórios ao liberar moléculas que inibem o influxo de granulócitos e monócitos, e são capazes ainda de reprogramar os macrófagos (Alessandri *et al.*, 2013; Fullerton e Gilroy, 2016).

Resumidamente, a apoptose, ou morte celular programada, é um processo que ocorre em todos os tecidos e contribui para a manutenção da homeostase, embora também ocorra em alguns processos patológicos. Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pela marginação e condensação da cromatina nuclear (picnose), encolhimento citoplasmático, fragmentação nuclear, formação de bolhas na membrana celular e exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática. O núcleo celular, subsequentemente, fragmenta-se em corpos fechados por membranas, semelhantes a microvesículas, denominados corpos apoptóticos, que são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas (Orrenius *et al.*, 2011; Poon *et al.*, 2014).

O estudo da apoptose de leucócitos durante a resposta inflamatória, tem sido de grande revelância, inclusive, nosso grupo e outros pesquisadores têm demonstrado moléculas-chaves e vias de sinalização envolvidas na apoptose, como a via do fosfoinositideo-3-quinase (PI3K) (como revisto em Alessandri *et al.*, 2013).

As PI3Ks são umas famílias de quinases lipídicas que fosforilam o grupo 3'-hidroxil dos fosfatidilinositois (PtdIns) resultando na formação do grupo de lipídios 3'-PtdIns. Elas são ativadas por vários estímulos, incluindo receptores de antígenos, citocinas e receptores de quimiocinas, que levam a ativação de vias de sinalização ajusante, como as quinases Ser/Thr, Akt, PDK1 and BTK, e controlam funções fundamentais de leucócitos como crescimento, proliferação, recrutamento, ativação e sobrevivência (Sugimoto *et al.*, 2016). Em relação a esta última, a via PI3K/Akt é relevante na mediação de sinais anti-apoptóticos e pró-inflamatório ativados por LPS, GM-CSF e TNF- α em granulócitos. Nosso grupo, por exemplo, demonstrou que inibidores de PI3K (wortmannin ou LY294002) usados no pico de uma resposta inflamatória eosinofílica é capaz de aumentar a apoptose de eosinófilos (Pinho *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2009).

Assim, estudar as vias de manutenção de sobrevivência de leucócitos nos sítios inflamatórios pode levantar possibilidades terapêuticas que visem o desligamento dessas vias, contribuindo para o interrompimento da resposta inflamatória e uma rápida resolução. Pensando nesse contexto,

esse trabalho visa o estudo de uma proteína de sobrevivência celular, chamada survivina, a qual será descrita oportunamente adiante.

1.3.5. Eferocitose

“Eferocitose” é um termo derivado da palavra latim “efero”, que significa “levar para o túmulo”. No contexto biológico, o termo eferocitose refere-se, exclusivamente, à fagocitose de corpos apoptóticos. Apesar de semelhante à outros processos fagocíticos, a eferocitose é um processo diferente da fagocitose e é dirigido por receptores e vias de sinalização distintos (**Figura 2**). Durante a eferocitose, a RhoA, da família das GTPases, é suprimida e a Rac1 coordena a formação do “eferossomo” (fagossomo) dos corpos apoptóticos, enquanto no processo fagocítico a RhoA é responsável pela formação do fagossomo. O eferossomo, então, sofre maturação e acidificação que destrói os corpos apoptóticos (Martin *et al.*, 2014; Kumar e Birge, 2016).

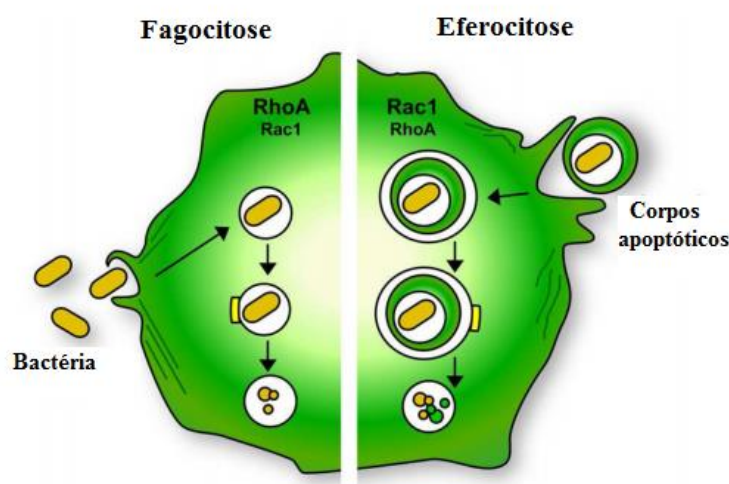


Figura 2. Diferença de sinalização intracelular do processo de fagocitose e eferocitose. *Adaptado de Martin et al., 2014.*

O processo de eferocitose, demonstrado na **Figura 3**, é importante para remover neutrófilos apoptóticos e impedir uma necrose secundária, a qual pode ser seguida de dano tecidual. Ele é iniciado pela produção de quimiocinas ou sinais de “encontre-me”, que incluem lisofosfatidilcolina (LPC), esfingosina 1-fosfato (S1P), fractalquina e nucleotídeos ATP e UTP, que são reconhecidos por receptores de macrófagos, como P2Y, S1P e CX3CR1. Os macrófagos migram em direção aos neutrófilos e reconhecem os sinais “fagocite-me” (ex. fosfatidilserina) emitidos por eles através de receptores, como o CD36, CD14. Essa interação

ligante-receptor ativa vias de sinalização de engolfamento e garante que células apoptóticas sejam efetivamente removidas do tecido (Martin *et al.*, 2014; Ortega-Gómez *et al.*, 2013; Alessandri *et al.*, 2013).

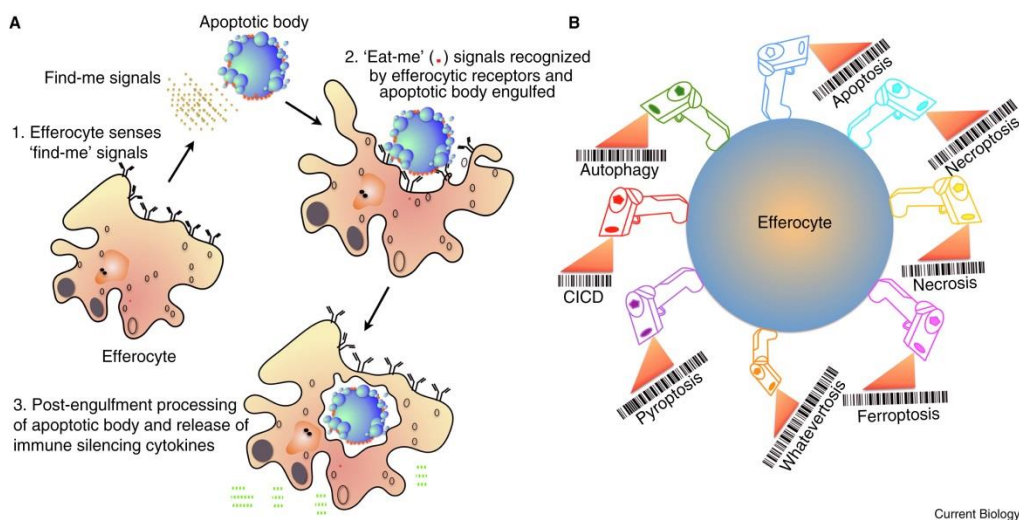


Figura 3. Representação esquemática de um processo fagocítico (Kumar e Birge, 2016).

A eferocitose também permite que os macrófagos estabeleçam uma plasticidade fenotípica, assumindo diferentes perfis baseados na expressão de receptores e na secreção de mediadores inflamatórios. Nesse processo denominado reprogramação de macrófagos, a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias é reduzida, enquanto ocorre a produção de TGF- β e IL-10, que atuam na resolução e no reparo tecidual, e de 15-LO, envolvida na geração de mediadores pró-resolutivos lipídicos por macrófagos (Lumbroso *et al.*, 2018).

Durante a reprogramação, os macrófagos pró-inflamatórios M1 reduzem a produção de mediadores pró-inflamatórios e assumem o perfil M2, com alta ação eferocítica e com perfil anti-inflamatório e pró-resolutivo (Headland e Norling, 2015; Ortega-Gómez *et al.*, 2013; Alessandri *et al.*, 2013). Os mediadores lipídicos produzidos pelos M2 contribuem para suprimir o recrutamento de neutrófilos e monócitos, enquanto que os mediadores anti-inflamatórios produzidos pelos mesmos induzem a apoptose de neutrófilos, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL1- β), e suprimem a ativação de monócitos (Headland e Norling, 2015).

Subsequentemente, os macrófagos são convertidos em um perfil promotor de resolução, os macrófagos resolutivos (Mres), por ação de mediadores pró-resolutivos, como 15-LO, e por ação de glicocorticoides. Eles apresentam baixa ação eferocítica e são conhecidos como CD11b^{low} (devido a baixa expressão da integrina de superfície celular CD11b. Expressam mediadores para o controle do processo fibrótico e de dano tecidual, como TGF β , proteínas antifibróticas, antioxidantes, mediadores pró-resolutivos e interrompem a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF α e IL1- β . (Ariel e Serhan, 2012; Alessandri *et al.*, 2013; Lumbroso *et al.*, 2018).

Por fim, no tecido, ocorre repovoamento de linfócitos, os macrófagos são removidos por drenagem linfática ou por apoptose, o processo inflamatório é finalizado e a homeostase tecidual é restabelecida. A falha nesses processos podem promover acúmulo de macrófagos no tecido e progredir o para o quadro crônico da inflamação, (Alessandri *et al.*, 2013; Ortega-Gómez *et al.*, 2013). A **Figura 4** ilustra brevemente o início e o fim do processo de inflamatório agudo.

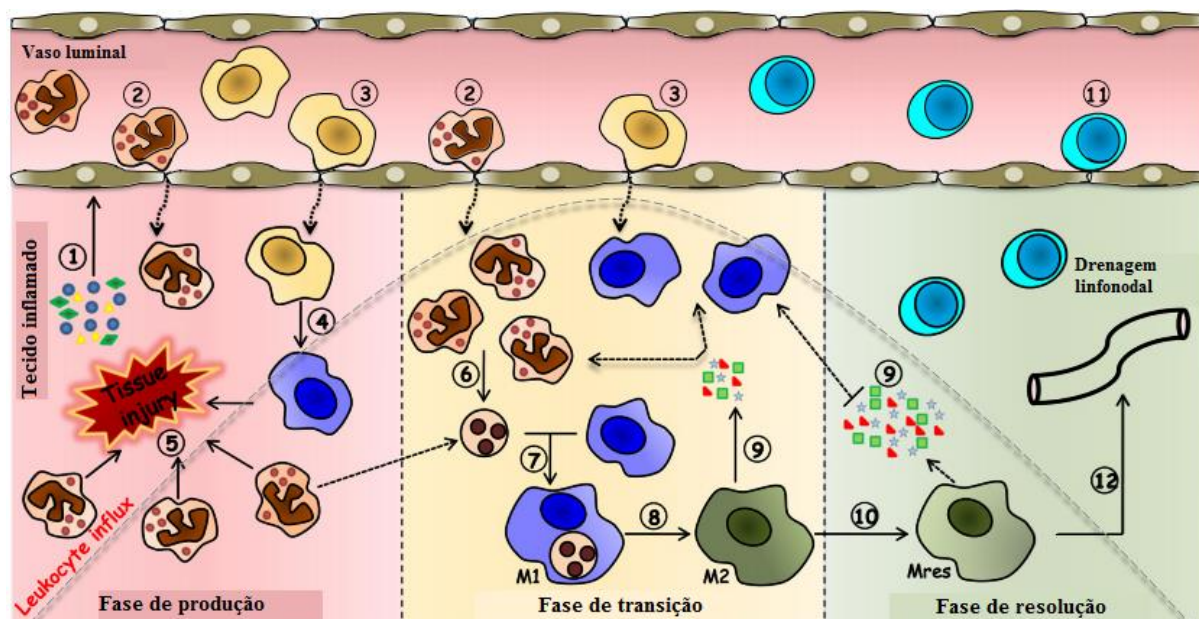


Figura 4. Etapas do processo inflamatório agudo.

Na etapa de produção, a lesão tecidual leva ao reconhecimento do padrão molecular (DAMPs e PAMPs) pelas células residentes (macrófagos teciduais, células dendríticas e células epiteliais) que produzem vários mediadores pró-inflamatórios (1). Os mediadores agem promovendo vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local, hiperemia e exsudação de proteínas plasmáticas e fluidos (edema). As células endoteliais também são ativadas para expressar moléculas de adesão celular e para apresentar mediadores quimioatrativos que permitirão a captura e o extravasamento de leucócitos (2-4). Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) extravasam para tecidos inflamados (2), seguidos por células mononucleares (3). Essas células podem ser ativadas e se tornar uma fonte importante de uma variedade de mediadores, o que permitirá a infiltração de leucócitos para realizar suas funções efetoras nos tecidos (5). Na fase de transição, os leucócitos sob ação de mediadores pró-resolutivos, começam a sofrer apoptose (6), seguido de fagocitose (7). Durante a eferocitose, os fenótipos dos macrófagos mudam de M1 para o fenótipo M2 (8). Os macrófagos M2 são altamente eferocíticos e produzem moléculas anti-inflamatórias e mediadores pró-resolutivos (9). Esses mediadores inibem o recrutamento adicional de PMNs, intensificam a migração de monócitos e amplificam a eferocitose. Os macrófagos M2 então mudam para o fenótipo Mresolution (Mres) (10), que apresenta fagocitose reduzida, mas produz proteínas antifibróticas e antioxidantes que limitam o dano tecidual e a fibrose. Na última etapa, a resolutiva, a produção de mediadores pró-resolutivos, agentes anti-inflamatórios e antifibróticos produzidos por Mres na fase anterior, leva à repopulação de linfócitos (11) e drenagem linfonodal ou apoptose de macrófagos (12) e fecha o processo inflamatório e restaura a homeostasia tecidual (adaptado de Alessandri *et al.*, 2013).

1.4. Homeostasia Tecidual

Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação dos agentes lesivos, infecciosos ou não, seguidos por uma fase de resolução e reparação, que é orquestrado por macrófagos. A ativação dessas células leva à produção de mediadores anti-inflamatórios e de reparação como o antagonista do receptor de IL-1, a IL-10, o TGF- β e o VEGF. A produção de fatores de crescimento promove a proliferação de células vizinhas e a síntese de proteínas, enquanto a produção de proteases e seus inibidores regulam a matriz extracelular e o remodelamento. O TGF- β local contribui para a regeneração tecidual e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, que sintetizam colágeno fibrilar intersticial. O VEGF promove angiogênese responsável pelo suprimento de oxigênio no tecido. Os macrófagos M2

produzem metaloproteinases e seus inibidores que controlam a fagocitose de vários componentes da matriz extracelular e secretam quimiocinas capazes de recrutar fibroblastos e células T regulatórias. Algumas evidências sugerem ainda que a interação de macrófagos com células progenitoras mesenquimais podem contribuir para o reparo e remodelamento tecidual (Ortega-Gómez *et al.*, 2013; Fullerton e Gilroy, 2016).

O reparo tecidual, portanto, é uma etapa finalizadora e imprescindível para a homeostase tecidual. Nesse sentido, se caso o gatilho inflamatório não for eliminado e o retorno a homeostase falhar, o processo inflamatório pode persistir e adquirir novas características: o infiltrado neutrofílico é substituído por macrófagos e, no caso de infecção, por células T. Se ainda assim, o efeito combinado dessas células não for suficiente para o fim da resposta inflamatória, o processo agudo de inflamação segue para um perfil crônico, com a formação de granulomas e tecidos linfoides terciários (Medzhitov, 2018; Ortega-Gómez *et al.*, 2013). Portanto, é importante investigar e investir em terapias que participem da resolução da resposta inflamatória e culminem no fim da inflamação pela ativação de sistemas endógenos e que resultem em uma restauração tecidual.

1.5. Terapias Pró-Resolutivas

O tratamento de patologias inflamatórias faz-se tradicionalmente por terapias anti-inflamatórias que se concentram em estratégias imunossupressoras para diminuir ou neutralizar o nível de mediadores pró-inflamatórios e/ou inibem o recrutamento de leucócitos e sua ativação. As terapias incluem fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), agonistas sintéticos do receptor de glicocorticóides (GC) e anticorpos ou inibidores de citocinas pró-inflamatórias específicas, como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina (IL)-1 (Fullerton e Gilroy, 2016).

Há alguns anos, reconheceu-se que as estratégias baseadas em resolução da inflamação têm potencial para o tratamento de múltiplas doenças inflamatórias. A terapia resolutiva baseia-se na limitação do recrutamento de neutrófilos, no controle de mediadores pró-inflamatórios, na indução da eferocitose e da apoptose de neutrófilos, no aumento do recrutamento de macrófagos não flogísticos e na indução da reprogramação de macrófagos (**Figura7**) (Ortega-Gómez *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2013; Fullerton e Gilroy, 2016).

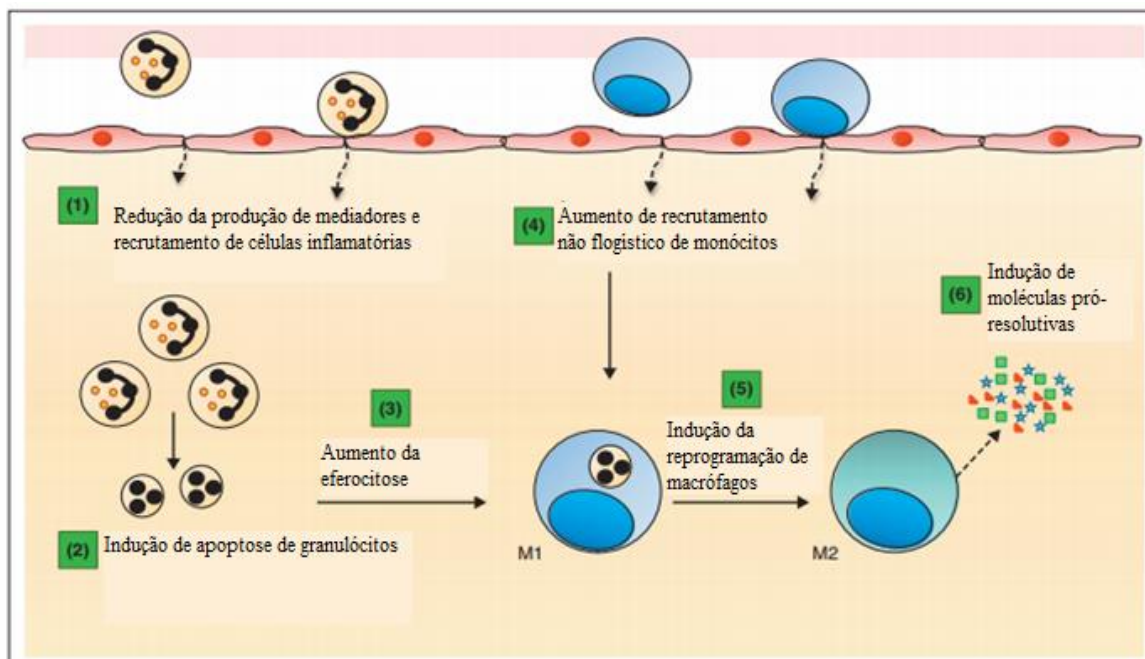


Figura 7. Propostas de terapias pró-resolutivas (adaptado de Sousa *et al.*, 2013)

Diante do exposto, combinar a tecnologia pró-resolutiva com a anti-inflamatória pode apresentar uma estratégia terapêutica mais eficiente em relação às abordagens existentes. Porém, para essa abordagem ter sucesso, é necessário que os agentes anti-inflamatórios não interfiram no processo resolutivo. Certos agentes, como os esteróides, podem ser considerados seguros para resolução, pois promovem a fagocitose de leucócitos apoptóticos e aumentam a liberação de anexina A1. No entanto, outros agentes como os inibidores da ciclooxigenase (COX)-2 podem ser considerado desvantajoso para a resolução, uma vez que bloqueiam a produção de prostaglandinas D2 e inibem o fator nuclear (NF) kappa B - NFκB, prolongando o processo resolutivo (Sousa *et al.*, 2013).

Algumas das estratégias pró-resolutivas são estudadas por nosso grupo. Vieira e colaboradores (2017) mostraram que a apoptose de neutrófilos induzida por ácidos graxos de cadeia curta, induzem uma resolução da inflamação mais rápida. Galvão e colaboradores (2017) utilizaram peptídeos extraídos da região N-terminal da anexina A1 em gota, induzida pela administração intra-articular de ácido úrico (MSU) em camundongos, e mostraram efeitos terapêuticos associados à apoptose de neutrófilos.

No modelo de inflamação alérgica pulmonar, induzida por ovoalbumina em camundongos, Magalhães e colaboradores (2018) demonstraram que angiotensina 1-7 aumenta os eventos eferocíticos e a apoptose de eosinófilos, além de reduzir a expressão e ativação de NF-κB,

contribuindo para a redução do remodelamento pulmonar e deposição de colágeno. Reis e colaboradores (2015) utilizaram o peróxido de hidrogênio no mesmo modelo e demonstraram que o peróxido induz a apoptose de eosinófilos, reduz o remodelamento e a deposição de muco e induz uma melhora na função pulmonar.

A angiotensina 1-7 também foi utilizada em modelo de artrite induzida por antígenos em camundongos e promoveu a resolução do processo inflamatório, por meio da apoptose de neutrófilos (Barroso *et al.*, 2017). Lima e colaboradores (2017) utilizaram o rolipram, um inibidor de fosfodiesterase-4 (PDE4), em modelo de pleurisia aguda em camundongos e demonstraram o aumento da produção de anexina-A1 e a apoptose de neutrófilos, eventos que contribuem para a resolução da inflamação. Vago e colaboradores (2016) utilizaram um inibidor sintético de proteases de neutrófilos (elastase e proteinase-3), sivelestat, responsável por clivar a anexina-A1 e produzir uma isoforma inativa em um modelo de pleurisia em camundongos. Como resultado, o sivelestat reduz o intervalo de resolução por aumentarem o número de neutrófilos apoptóticos. Em conjunto, esses estudos demonstraram o potencial do desenvolvimento de terapias pró-resolutivas para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas.

1.6. Proteínas Inibidoras De Apoptose

A apoptose, como descrito anteriormente, é um evento fundamental para a resolução da inflamação. Esse processo é a soma de fatores positivos e negativos que culminam nesse tipo de morte celular. Entre os reguladores negativos desse processo encontramos as proteínas anti-apoptóticas conhecidas como proteínas inibidoras de apoptose (IAPs, da sigla em inglês: inhibitors of apoptosis proteins) (Vasudevan e Ryoo, 2015).

A família IAPs inclui as proteínas que apresentam o domínio BIR, correspondente a 70 aminoácidos de cadeia longa de repetições de IAPs de baculovírus (BIR) na extremidade N-terminal, que são essenciais, mas não suficientes, para a sua atividade anti-apoptótica. Os mamíferos apresentam 8 proteínas descritas e são elas: proteína inibidora de apoptose neural de mamíferos (NAIP, codificada pelo gene BIRC-1), proteína inibidora de apoptose celular-q (cIAP-1, codificada pelo BIRC-2), proteína inibidora de apoptose celular-2 (c-IAP-2, codificada pelo BIRC-3), proteína inibidora de apoptose ligada ao cromossomo X (XIAP, BIRC-4), a survivina (BIRC-5), a enzima de conjugação de ubiquitina contendo BIR (BRUCE, BIRC-6), a proteína inibidora de apoptose associada ao melanona (MLIAP, BIRC-

7) e a proteína inibidora de apoptose tipo 2 (ILP-2, BIRC-8)(Sharma *et al*, 2017; Garg *et al*. 2016).

Como proteínas anti-apoptóticas, sua alta expressão frequentemente é revelada em células cancerígenas e estão associadas ao início, à progressão do câncer e a quimiorresistência. Além disso, vários estudos têm revelado seu papel em processos diferentes da apoptose como proliferação, diferenciação, migração celular e na modulação da sinalização inflamatória (Sharma *et al*, 2017).

1.6.1 Survivina

O membro das IAPs denominado survivina, codificado pelo gene *BIRC5*, foi descoberto por Grazia Ambrosini e Dario Altieri em 1997. Essa proteína é encontrada em diferentes tipos celulares e estruturalmente apresenta apenas um domínio BIR e um domínio C-terminal helicoidal. A survivina humana apresenta 6 variantes diferentes de splicing, mas as três mais frequentes compreendem 98% da expressão de mRNA de *BIRC5*. São elas, a survivina do tipo selvagem (survivina-WT, com 142 aminoácidos –aa), survivina com o éxon 2 alternativo (survivina-2B, 165 aa) e a survivina com deleção do éxon 3 (survivina- Δ Ex3, 137 aa) (Gravina *et al.*, 2017; Xiao e Li, 2015; Ebrahimiyan *et al.*, 2018).

A survivina apresenta múltiplas funções associadas à proliferação celular e inibição de apoptose. A variante survivin- Δ Ex3 é encontrada no núcleo e forma um complexo do passageiro cromossômico em conjunto com a borealina (proteína do centrômero inferior), Aurora quinase B e INCENP, auxiliando na divisão celular (Ebrahimiyan *et al.*, 2018).

As variantes survivina-WT e survivina-2B, encontradas no citoplasma, apresentam ação anti-apoptóticas por diferentes mecanismos. Em um destes, a survivina forma um heterodímero com inibidor de apoptose XIAP e liga-se à caspase-3 e -7 inibindo a apoptose (**Figura 8**). Uma segunda via acontece com a ligação da survivina ao segundo ativador mitocôndrial de caspase (SMAC/DIABLO), que restringe a liberação e ativação de caspase-9 (Ebrahimiyan *et al.*, 2018).

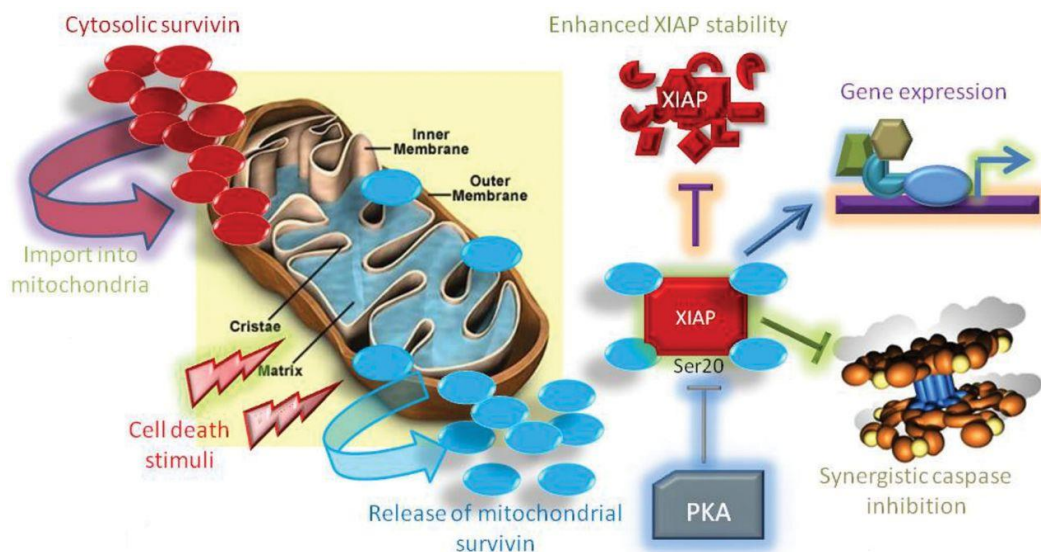


Figura 8. Representação da interação da survivina com a X-IAP para a inibição caspases.

A survivina pode ser armazenada na mitocôndria e sob estímulos de morte ela é liberada no citosol. Neste local, ela interage com a X-IAP, formando um complexo que é negativamente regulado pela fosforilação da Ser20 da survivina pela proteína quinase A (PKA). Essa interação confere maior estabilidade a XIAP, que resulta em expressão gênica aumentada (NF- κ B, por exemplo) e inibição sinérgica de caspases iniciadoras (Altieri, 2010).

Além das localidades subcelulares descritas, a survivina também é encontrada fora da célula (Khan *et al* 2011; Khan *et al*, 2015; Khan *et al*, 2009). A presença de survivina extracelular é descrita como consequência da secreção vesicular de microvesículas derivadas de endossomos tardios, denominadas exossomos. Essas vesículas são heterogêneas em relação ao tamanho e conteúdo, que pode incluir RNA e proteínas e possuem funções de comunicação inter e extracelular (Chen *et al.*, 2016; Gravina *et al.*, 2017; Xiao e Li, 2015; Ebrahimiyan *et al.*, 2018; Khan *et al* 2011; Khan *et al*, 2015; Khan *et al*, 2009; Fenstermaker *et al.*, 2018).

Em geral, estudos envolvendo a survivina extracelular são muito recorrentes em modelos de cânceres, apesar de haver alguns trabalhos descrevendo a survivina extracelular em processos inflamatórios. Em pacientes com artrite reumatóide, por exemplo, foram encontradas altas concentrações de survivina no plasma sanguíneo e no líquido sinovial (Fenstermaker *et al.*, 2018). Outro trabalho, o de Mera e colaboradores (2008), demonstrou que a survivina extracelular é capaz de aumentar a expressão de integrinas via MAPK P38 e PI3K em pacientes com artrite reumatóide, sugerindo que essa proteína pode estar envolvida na interação célula/tecido durante uma resposta imune.

1.6.2. Survivina e processos imunes

A survivina apresenta atividades em diferentes eventos do processo imune, que incluem, além da sobrevivência, a diferenciação, maturação e o reconhecimento celular. Um exemplo é o envolvimento na diferenciação e maturação de células dendríticas, de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e na expressão de MHC classe II (Ebrahimiyan *et al.*, 2018). Em relação ao envolvimento no reconhecimento celular, Fenstermaker e colaboradores (2018) mostraram que epítomos de survivina são expostos na superfície celular, via proteossoma, em diversas linhagens cancerígenas para o reconhecimento imunológico por células T. Além disso, na granulocitopoiese, a expressão de survivina favorece a expansão de neutrófilos imaturos (Ebrahimiyan *et al.*, 2018).

Em doenças autoimunes como a artrite reumatóide (AR), a inibição de survivina reduz o dano tecidual e a dor na cavidade articular do joelho. Além disso, o nível de survivina no soro de pacientes AR também é significativamente maior que o de indivíduos saudáveis e esse aumento está correlacionado com a expressão de citocinas do tipo Th1 e Th17 e com a ativação de integrinas (Bokarewa, 2005; Ebrahimiyan *et al.*, 2018).

Em 2008, como supracitado, Mera e colaboradores, demonstraram que a survivina liga-se a granulócitos, linfócitos e monócitos e induz a ativação de α -caderinas, β -integrinas (CD11b) e seus ligantes ICAM-1, via p38 da MAPK e PI3K. Essa ativação de integrinas pode ter um possível impacto na circulação de células inflamatórias durante a artrite. Apesar desses indícios do envolvimento de survivina com doenças inflamatórias serem relevantes, os mecanismos pelo qual essa relação ocorre ainda permanecem pouco elucidados.

1.6.3. Antagonistas de survivina

Alguns antagonistas de survivina foram desenvolvidos para estudos experimentais e para o uso clínico, entre eles o 9EZN3042, um *antisense* composto de ácidos nucleicos quimicamente modificados e o YM155 (Sapra, *et al.*, 2010);

Os ácidos nucleicos quimicamente modificados têm sido amplamente utilizados em diferentes campos terapêuticos moleculares por apresentar vantagens que incluem estabilidade de cadeia dupla de DNA e RNA e ainda resistência a ação enzimática de nucleases, por exemplo. Essas modificações químicas podem ocorrer na porção glicosídica do nucleotídeo como o 2'-O-

alquilo, 7 2'-O, 4'-C-metileno, *Locked Nucleic Acids* (LNA), o 8-10 ácidos arabinonucleicos (ANA), ou ainda ocorrer nas bases nucleotídicas como a introdução do componente C5-propinile pela substituições de 5- (N-aminohexil) carbamoílo (Suresh e Priyakumar, 2013; Astakhova *et al.*, 2013).

O EZN3042 é um específico antagonista de RNA mensageiro contendo uma região designada “locked nucleic acid *antisense* oligonucleotide (LNA-ON)”, desenvolvido pela Enzon Pharmaceuticals, utilizado na pesquisa do câncer (Sapra, *et al.*, 2010). Os LNA-ON são uma classe de análogos de RNA, nos quais o anel da ribose está bloqueado em uma conformação ideal para a ligação de Watson-Crick.

O LNA é um oligonucleotídeo que apresenta uma ponte de metileno ($-O-CH_2-$) entre o 2'-oxigênio e o 4'-carbono do anel ribose, bloqueando o anel em um único estado conformacional, ideal para a ligação de Watson-Crick. Essa alteração estrutural aumenta a afinidade da molécula com as cadeias complementares de DNA e RNA, possibilitando uma aplicabilidade na terapia *antisense*. Nesta última, a inserção de uma fita de RNA sintetizada a partir de oligonucleotídeos LNA bloqueia a maturação do RNAm de interesse e, conseqüentemente, inibe a tradução do gene correspondente (Suresh e Priyakumar, 2013; Campbell e Wengel, 2011). Além disso, o LNA é capaz de entrar em células sem a presença de um veículo, apresentando notável eficiência no silenciamento gênico (Souleimanian *et al.*, 2012; Stein *et al.*, 2010). Em células da próstata 15PC3, o EZN3042 mostrou ser um potente regulador negativo da expressão de mRNA da survivina e provocou efeitos na apoptose e no ciclo celular dessas células (Hansen *et al.*, 2008). *In vivo*, o EZN-3042 também demonstrou atividade em modelo de câncer de pulmão em murinos, quando usado em combinação com paclitaxel (Sapra, *et al.*, 2010). Em células imunes saudáveis ainda não foi desenvolvido testes utilizando o EZN3042.

O YM155, brometo de sepantronio, foi descoberto pelos laboratórios da companhia farmacêutica Astellas Pharma em 2007. Os estudos iniciais do YM155 foram conduzidos em células de carcinoma epitelial cervical humano (HeLa) e em células de ovário de camundongos, o qual apresentou efeitos antiproliferativos e de morte celular. Atualmente, o YM155 está sendo avaliado em ensaios clínicos de fase II em pacientes com carcinoma pulmonar avançado e melanoma (Giaccone *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2011). O mecanismo de ação do YM155 não é composto de uma única via direta, mas diferentes mecanismos para a redução da expressão de survivina estão sendo descritos. O YM155 pode ligar-se diretamente

a fatores como o *Interleukin enhancer-binding factor 3*(ILF3) e o p54/nrb e pode ainda bloquear a ligação do fator de transcrição da survivina, sp1, ao DNA. Ambos os processos culminam na inibição da expressão da survivina (Rauch *et al.*,2014) (**Figura 10**).

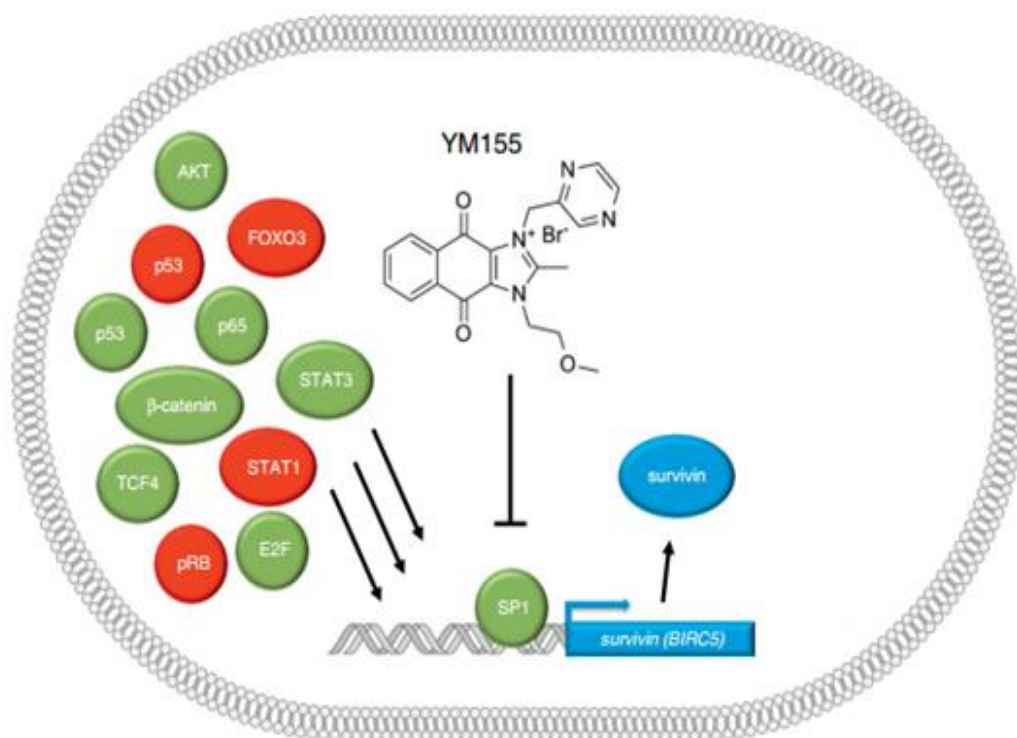


Figura 10. Mecanismo de ação da YM155 envolvendo o fator de transcrição SP1. O composto é capaz de impedir a ligação do fator de transcrição ao DNA e, conseqüentemente, a transcrição do RNA mensageiro para a survivina (adaptado de Rauch *et al.*,2014)

Os efeitos pró-apoptóticos do YM155 podem incluir a redução da expressão de outras moléculas anti-apoptóticas. Em células HL60 tratadas com droga, a apoptose ocorre pela supressão da survivina associada à redução de Bcl-2, Mcl-1 Mcl-1s e XIAP. Além disso, o efeito anti-sobrevida do YM155 também foi atribuído ao dano direto ao DNA (Necochea-Campion *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2015).

Visto a importante contribuição da survivina para a patogenia do câncer e os poucos estudos que analisam e exploram o papel da survivina na inflamação, este trabalho teve como objetivo estudar a função dessa proteína em um processo inflamatório agudo.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral: Estudar o papel da survivina em células inflamatórias e durante uma resposta inflamatória aguda.

2.2.Objetivos Específicos:

2.2.1. Efeito da inibição da survivina em modelo experimental de resposta inflamatória aguda induzida por LPS

1. Investigar a expressão de survivina em lavado pleural durante uma resposta inflamatória aguda – pleurisia aguda induzida por LPS.
2. Verificar a expressão de survivina em neutrófilos e macrófagos durante uma pleurisia aguda induzida por LPS.
3. Analisar o efeito do tratamento com um inibidor de survivina (EZN3042) na resposta inflamatória induzida por LPS.
4. Verificar se a inibição da survivina pelo EZN3042 induz a apoptose de leucócitos recuperados do sítio inflamatório.
5. Observar o efeito da inibição da survivina na eferocitose de neutrófilos apoptóticos.

2.2.2. Efeito da inibição da survivina em modelo experimental de resposta inflamatória aguda induzida por MSU (gota).

1. Analisar o efeito do tratamento com um inibidor de survivina (EZN3042) na resposta inflamatória induzida por MSU.
2. Verificar se a inibição da survivina pelo EZN3042 induz a apoptose de leucócitos recuperados da cavidade intrarticular de murinos.
3. Avaliar a nocicepção de animais induzidos com gota, tratado com o EZN3042.

2.2.3. Efeito da inibição da survivina em cultura de neutrófilos humanos:

1. Estudar o efeito do YM155 na sobrevivência dos neutrófilos;
2. Analisar o efeito da adição de survivina recombinante na sobrevivência de neutrófilos

3. METODOLOGIA

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J 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, seis camundongos por gaiola pequena com livre acesso à ração, água, e em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h/12h). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA, Protocolo nº. 336 / 2015)

3.2. Estudo da survivina em modelo de pleurisia induzida por LPS

3.2.1. Cinética inflamatória da survivina

i. Indução de pleurisia por LPS

O modelo murino de pleurisia induzida por LPS já foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa, como descrito por Sousa *et al.*, 2010. Os camundongos receberam 100 µl de solução de LPS (250ng/intrapeural – i.p. - *Escherichia coli* sorotipo O:111:B4 – Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) por meio de injeção intrapeural e, para controle, receberam 100µl de solução salina. Os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica em diferentes tempos (0h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h) e as células da cavidade pleural foram recuperadas por meio de lavado com 2ml de PBS 1x.

ii. Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo (Becton Dickenson FACScan e CELL quest software) foi utilizada para avaliar a expressão da survivina em diferente células durante a cinética. Para essa análise as células coletadas do lavado pleural receberam uma marcação extracelular de neutrófilos e macrófagos, seguidas de uma marcação intracelular de survivina.

Marcação extracelular: Usamos um anticorpo para o marcador de superfície denominado *Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D* (Ly6G), presente em neutrófilos e para o marcador F4/80 presente em macrófagos. Para fazer a marcação, as células do lavado pleural foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Os *pellets* resultantes de

cada amostra foram resuspendidos em 10 μ L de Fc block (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) diluídos em PBS/BSA 1 % por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, foram realizadas as marcações de superfície com 20 μ L de Ly6G (APC – BD Bioscience, San Diego, CA, USA) e 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. Seguido esse tempo, as amostras foram lavadas com 150 μ L de PBS/BSA 1%, para interromper a reação do anticorpo, centrifugadas e o *pellet* resuspendido em 100 μ L PBS/BSA 1%. Para dar início a marcação intracelular, é necessário que as marcações de superfície sejam fixadas com 100 μ L de solução de formaldeído 4% por 20 minutos, de forma que a etapa seguinte não remova os anticorpos já ligados.

Marcação Intracelular: Após os 20 minutos de fixação, foram adicionados 200 μ L de PBS/BSA 1%, seguido de 100 μ L de *permwash*, incubado por 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 1500 rpm, por 5 minutos. O *pellet* resultante foi resuspendido em 20 μ L de anticorpo anti-survivina (Cell Signalling), incubado a 60 minutos protegido da luz e centrifugado por 1.500 rpm, 5 minutos. Por fim, as amostras foram lavadas com PBS 1X, o anticorpo secundário foi adicionado e incubado por 30 minutos, as amostras foram lavadas, centrifugadas e resuspendidas em 200 μ L de PBS/BSA 1%. Após a marcação intracelular, as amostras foram lidas no citômetro. O resultado das marcações das amostras foi analisado no software FlowJo 7.5.3 (Treestar, Ashland, OR, USA).

3.2.2. Terapia farmacológica

A pleurisia aguda por LPS foi induzida conforme o item 3.2.1.i. Após 4 ou 8 horas de indução por LPS, os camundongos foram tratados com o *antisense* de mRNA controle (EZN3046, Enzon Pharmaceuticals) e o *antisense* de mRNA de survivina (EZN3042, Enzon Pharmaceuticals). Seis grupos foram analisados no total: um grupo com injeção de 100 μ L PBS 1x intrapleural, um grupo injetado com 100 μ L de LPS intrapleural, três grupos de animais LPS tratados com EZN3042 em seis doses diferentes (0.1, 1, 3, 10 e 30 mg/kg) e um grupo LPS+EZN3046 (3mg/kg). O lavado pleural foi realizado 2 e 4 horas após o tratamento, o lavado coletado foi centrifugado a 1500rpm por 5 minutos e o *pellet* resuspendido com 200 μ L de PBS 1x. Dessa suspensão, 10 μ L foi colhido para contagem de células total e 20 μ L para a confecção de lâminas em citocentrífugas para a quantificação do número de neutrófilos e macrófagos viáveis e apoptóticos. O restante das células foram armazenadas para futuras análises proteicas.

3.2.3. Caracterização de células inflamatórias em pleurisia

As lâminas preparadas em citocentrífugas 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. Foram contadas 100 células por campo em três campos aleatórios no microscópio óptico (aumento de 100 vezes) de cada preparação.

3.2.4. Análise morfológica de apoptose e de eferocitose

As células com morfologia apoptótica e macrófagos eferocíticos foram contados com o auxílio de um microscópio óptico, na razão de 100 células por campo, em 5 campos aleatórios. Os resultados foram representados por números de células.

3.3. Estudo da survivina em modelo de gota

O modelo de gota foi realizado conforme (Amaral *et al.*, 2012). Os animais foram anestesiados (15 mg/kg de ketamina/xilazina, i.p. Syntec, São Paulo, Brasil) e foram injetados 10µl de PBS-1xna articulação tibiofemoral no grupo denominado controle e 10µl de cristais de ácido úrico - MSU (100 µg/ml) em dois grupos, o veículo e o denominado grupo tratado. Após 12h, este último grupo recebeu uma injeção intra-articular do *antisense*-survivina (EZN3042, Enzon Pharmaceuticals) na dose definida em 3.3.2. Os camundongos foram eutanasiados por sobredosagem anestésica após 6h de tratamento e as cavidades articulares foram lavadas com PBS-1X (duas vezes com 5 µL cada) para a posterior contagem total, diferencial de células e para a contagem de eventos apoptóticos. Os tecidos periarticulares das articulações acometidas pela gota foram removidas para a uma análise de western blot.

3.3.1. Avaliação de hipernocicepção em modelo de gota

Duas horas antes dos animais serem submetidos ao teste anterior (3.3), foi realizada uma avaliação da hipernocicepção mecânica descrito por Sachs e colaboradores (2011), para observar a resposta hipernociceptiva articular mecânica após a injeção de cristais de MSU, através de um medidor eletrônico de pressão chamado Von Frey.

3.4. Estudo da survivina em neutrófilos humanos estimulados *in vitro* com LPS

3.4.1. Isolamento de neutrófilos

Para realização do ensaio *in vitro* com neutrófilos humanos, foram feitas as purificações do sangue periférico de pelo menos 6 doadores diferentes, saudáveis e 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 (1500 rpm, sem freio) por 30 minutos, à temperatura ambiente e houve uma formação de camadas celulares de acordo com suas 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 10 minutos, à temperatura ambiente. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 1 mL de RPMI e deste foi retirado 10ul de amostra adicionada a 90ul de azul de tripan (para exclusão de células mortas) e os neutrófilos foram contados na câmara de Neubauer (como descrito no item 3.6). Através da contagem total de neutrófilos foi feito um plaqueamento da mesma quantidade de células para cada poço da placa de 96 poços (1×10^6 células/poço) em meio RPMI-1640, submetidos aos tratamentos necessários e incubados em estufa com atmosfera umidificada, 5% de CO₂ e à 37°C.

3.4.2. Tratamento com YM155

Os neutrófilos plaqueados foram divididos em 3 grupos: um grupo somente com células em meio RPMI (controle), um grupo estimulado com LPS (500 ng/ml) e um grupo estimulado com LPS e 100 nM de YM155 (*Cayman Chemical Company*). O YM155 foi adicionado na cultura 1 hora após a incubação com LPS. Três horas após a adição do YM155, as células de todos os grupos foram retiradas da cultura e submetidas à análise bioquímica de apoptose (anexina-V/PI), conforme descrito no próximo item.

Outro experimento foi conduzido como o anterior, porém, analisamos a apoptose por morfologia (item 3.2.4.) após 6 horas de tratamento. As células foram recolhidas, e 30ul do

volume total de cada poço foi utilizado para a confecção de citolâminas. O restante do volume foi centrifugado (1.500 rpm, 5 minutos) e armazenado à -20°C para posteriores análises.

3.4.3. Análise bioquímica de apoptose

As células ressuspensas do item 3.4.3. foram submetidas à avaliação de apoptose pela marcação com anexina-V-FITC + PI, conforme descrito abaixo. Inicialmente, as células suspensas em PBS/BSA 1% foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Os *pellets* resultantes de cada amostra foram ressuspensos em 100 µL do tampão presente no kit (Binding Buffer), seguido com a adição de 2 µL de anexina e de PI e incubado por 15 minutos para posterior leitura no citômetro. O resultado das marcações das amostras foi analisado no software FlowJo 7.5.3 (Treestar, Ashland, OR, USA).

3.4.4. Análise de sobrevivência de neutrófilos com survivina recombinante

Neutrófilos isolados, conforme descrito anteriormente, foram estimulados com LPS (500ng/ml) por 1 hora. Após a estimulação foi adicionado 20ng/ml ou 100 ng/ml de survivina recombinante (*Abcam, Cambridge, USA*) para cada poço. Os grupos foram divididos em controle (somente com meio RPMI, suplementado com 10% de soro sanguíneo humano), um grupo estimulado com LPS e um terceiro grupo estimulado com LPS acrescido de survivina recombinante nas concentrações de 20 ou 100 ng/ml. A cultura foi incubada em estufa com atmosfera umidificada, 5% de CO₂ e à 37°C por 18 ou 20 horas. Após esses tempos, 30µl do volume de cada poço foram utilizados para as preparações de citolâminas e os demais volumes foram submetidos à centrifugação (1500 rpm, 5 minutos) e armazenado à -20°C com solução de lise.

3.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o software *GraphPadPrism 7.0*. As análises entre dois 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 ±EPM (erro padrão da média) e o nível de significância foi definido como $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo do papel da survivina na manutenção da resposta inflamatória no modelo de pleurisia induzida por LPS em murinos.

i. Administração de LPS altera a expressão de survivina na cavidade pleural

Para avaliar se ocorre a expressão da survivina durante uma resposta inflamatória aguda, foi realizado um estudo temporal, no qual as células inflamatórias foram recolhidas em diferentes tempos após a indução por LPS (0, 4, 8, 12, 24, e 48h) e submetidas a uma avaliação da expressão de survivina pela técnica de *Western Blot*, como demonstrado na **Figura 11-B/C**. Nota-se que a expressão de survivina já aparece na cavidade pleural não inflamada, injetada com PBS. Porém, 4h após a injeção de LPS a expressão de survivina aumentou em relação ao PBS, reduzindo a partir de 8 horas. É necessária uma repetição do experimento para conseguirmos realizar um teste estatístico.

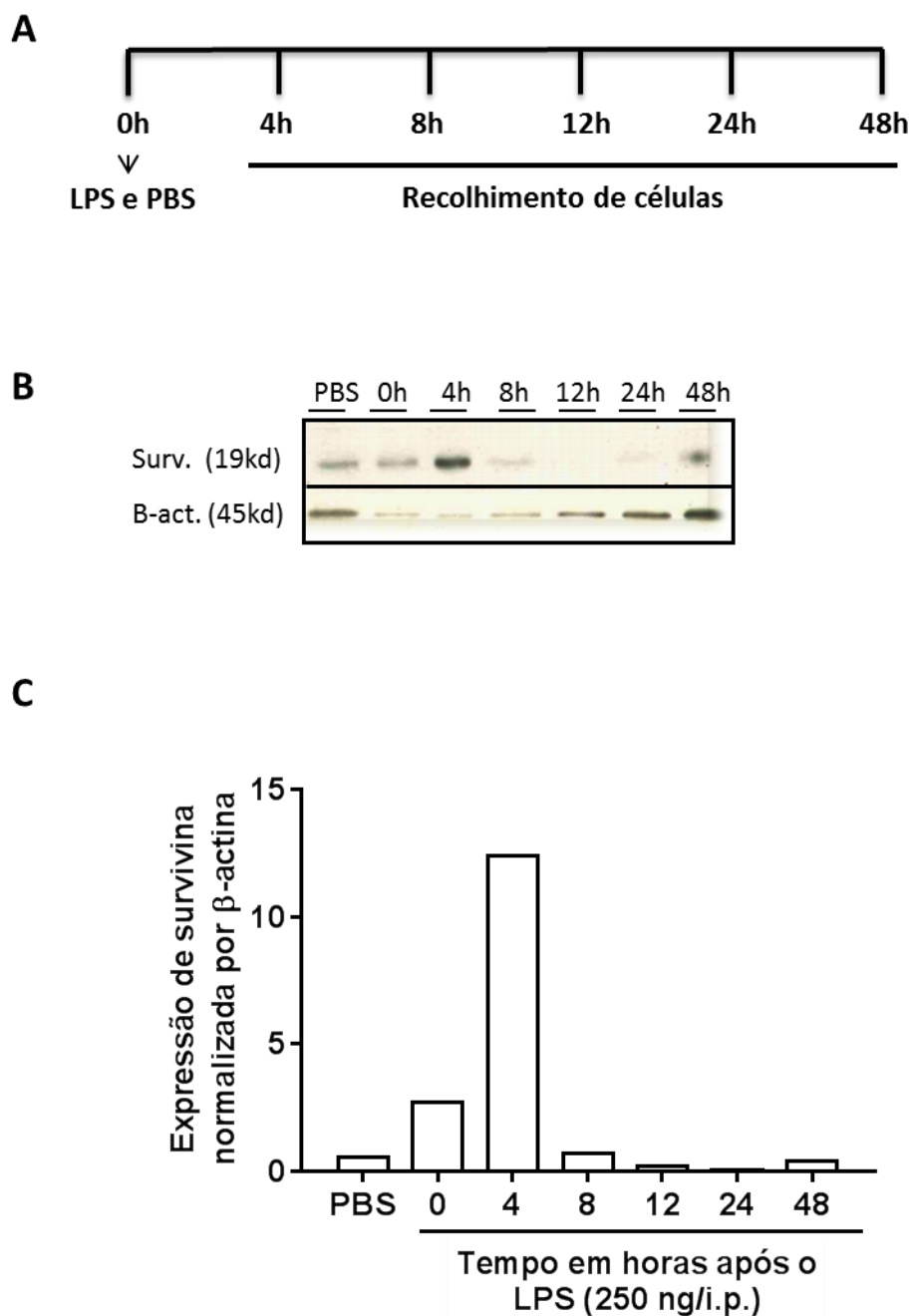


Figura 11. Cinética da expressão de survivina durante uma pleurisia aguda induzida por LPS. O LPS (250 μ g/intrapleura-i.p.) foi injetado nas cavidades pleurais de camundongos e as células presentes nas cavidades foram recolhidas por lavado pleural com PBS 1x em tempos determinados (0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas) após o LPS. As células de cada animal foram agregadas por grupo (n=5 animais/grupo) e submetidas à técnica de *western blot* para a marcação de survivina (surv.) e β -actina (β -act.). **A:** Desenho experimental utilizado. **B:** Expressão de bandas de survivina avaliada por *Western Blot*, com sua respectiva representação gráfica (**C**).

- ii. *Survivina é expressa em neutrófilos (LY6G) e macrófagos (F4/80) durante uma resposta inflamatória aguda induzida por LPS.*

Foi observado que a expressão de survivina é alterada durante uma resposta inflamatória aguda. Porém, em um lavado pleural há diferentes tipos celulares, o que dificulta representar a real expressão de survivina nos protagonistas celulares de uma inflamação aguda. Dessa forma, foi realizada uma citometria de fluxo a fim de se observar o perfil de expressão de survivina nos neutrófilos (**Figura 12**) e macrófagos (**Figura 13**).

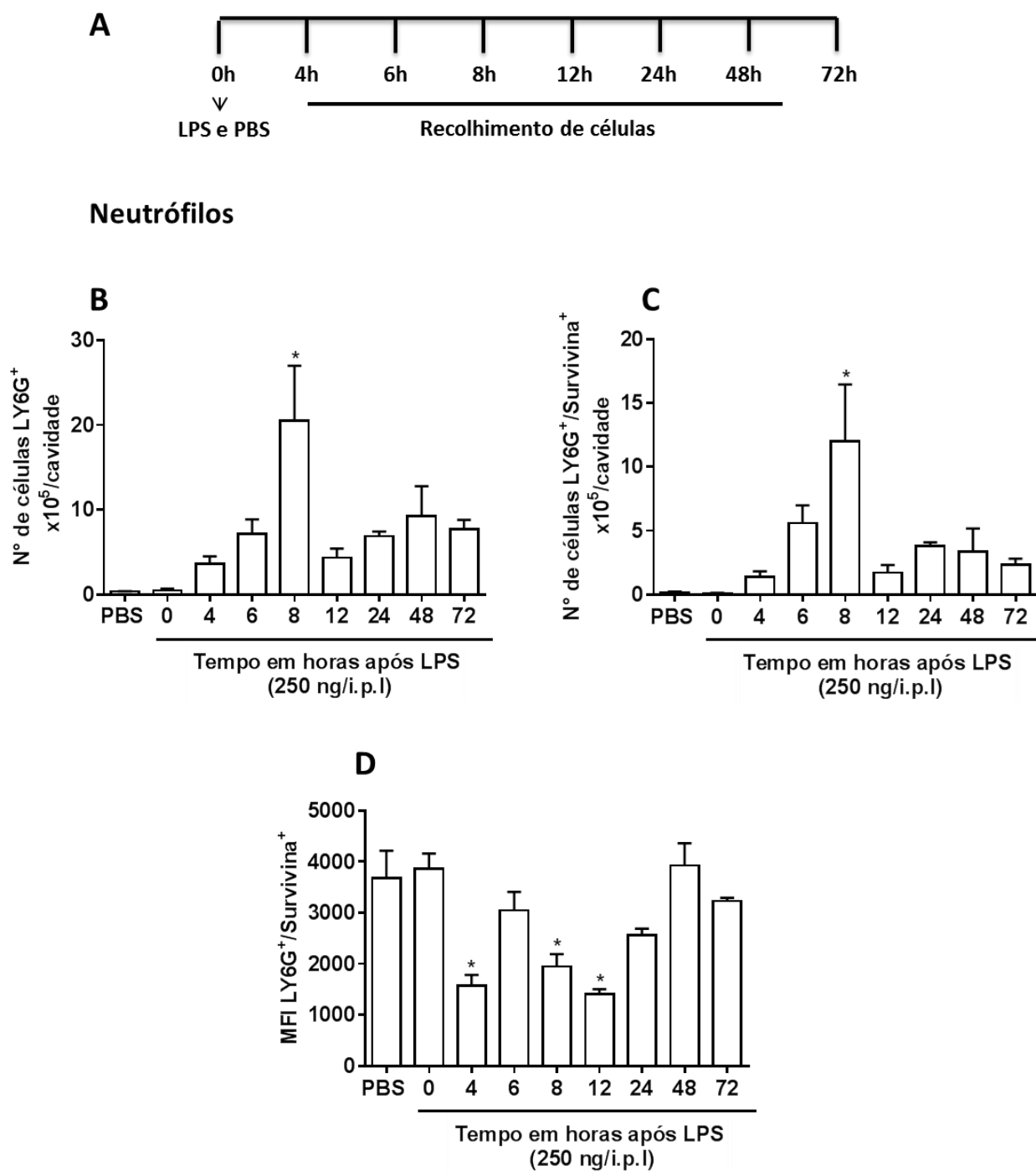


Figura 12. Cinética da expressão de survivina em neutrófilos (LY6G⁺) durante pleurisia aguda induzida por LPS.

O experimento ocorreu conforme em **A**: O LPS (250 ng/intrapeural – i.p.) foi injetado na cavidade intrapeural de camundongos e lavados das cavidades foram realizados em diferentes tempos (0, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas) após o LPS. As células recolhidas por animal (n=5 animais/grupo-tempo) foram submetidas às marcações celulares de superfície (anti-LY6G, para marcação de neutrófilos) e marcação intracelular (anti-survivina). As amostras marcadas foram lidas em um citômetro de fluxo e os resultados foram apresentados como \pm EPM. **B**: Nº de neutrófilos, **C**: Nº de neutrófilos que expressam survivina e **D**: MFI de survivina em neutrófilos. Os resultados foram representados como \pm EPM. *p<0,05 comparado ao PBS.

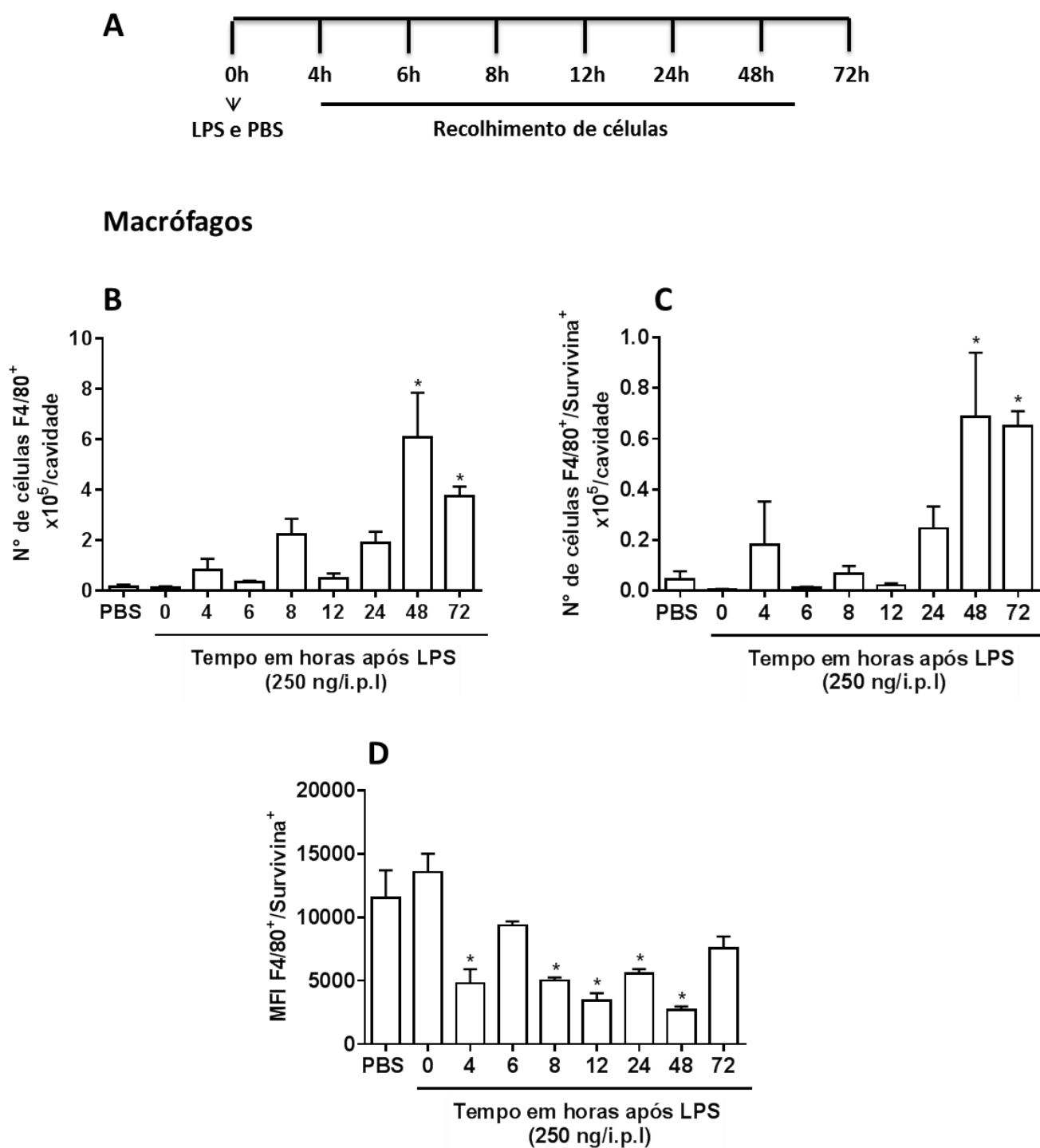


Figura 13. Cinética da expressão de survivina em macrófagos (F4/80) durante pleurisia aguda induzida por LPS.

O experimento ocorreu conforme em **A**: O LPS (250 ng/intrapeleural – i.p.) foi injetado na cavidade intrapeleural de camundongos e lavados das cavidades foram realizados em diferentes tempos (0, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas) após o LPS. As células recolhidas por animal (n=5 animais/grupo-tempo) foram submetidas às marcações celulares de superfície (anti-F4/80, para marcação de macrófagos) e marcação intracelular (anti-survivina). As amostras marcadas foram lidas em um citômetro de fluxo e os resultados foram apresentados como \pm EPM. **B**: N° de macrófagos, **C**: N° de macrófagos que expressam survivina e **D**: MFI de survivina em macrófagos. Os resultados foram representados como \pm EPM. . * $p < 0,05$ comparado ao PBS.

Como indicado na Figura 12, a expressão de survivina é correspondente ao tempo de maior acúmulo de neutrófilos, na 8ª hora, e maior acúmulo de macrófagos, na 48ª e 72ª hora, após a estimulação por LPS. Esses resultados em conjunto com o resultado anterior sugerem que a survivina tem participação em uma resposta inflamatória aguda.

iii. Survivina contribui para a sobrevivência de células inflamatórias durante uma resposta inflamatória aguda.

Considerando que a manutenção da sobrevivência celular é o papel mais explorado da survivina, tratamos animais com EZN3042 previamente injetados com LPS e analisamos o número de leucócitos totais e diferencial, quantidade de eventos apoptóticos e eferocíticos. Esse experimento foi conduzido com três diferentes doses de EZN3042 (3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg) e com seu controle, EZN3046 (30 mg/kg). O tempo de tratamento foi baseado no tempo de maior quantidade de neutrófilos expressando survivina. Os resultados estão representados na **Figura 14**.

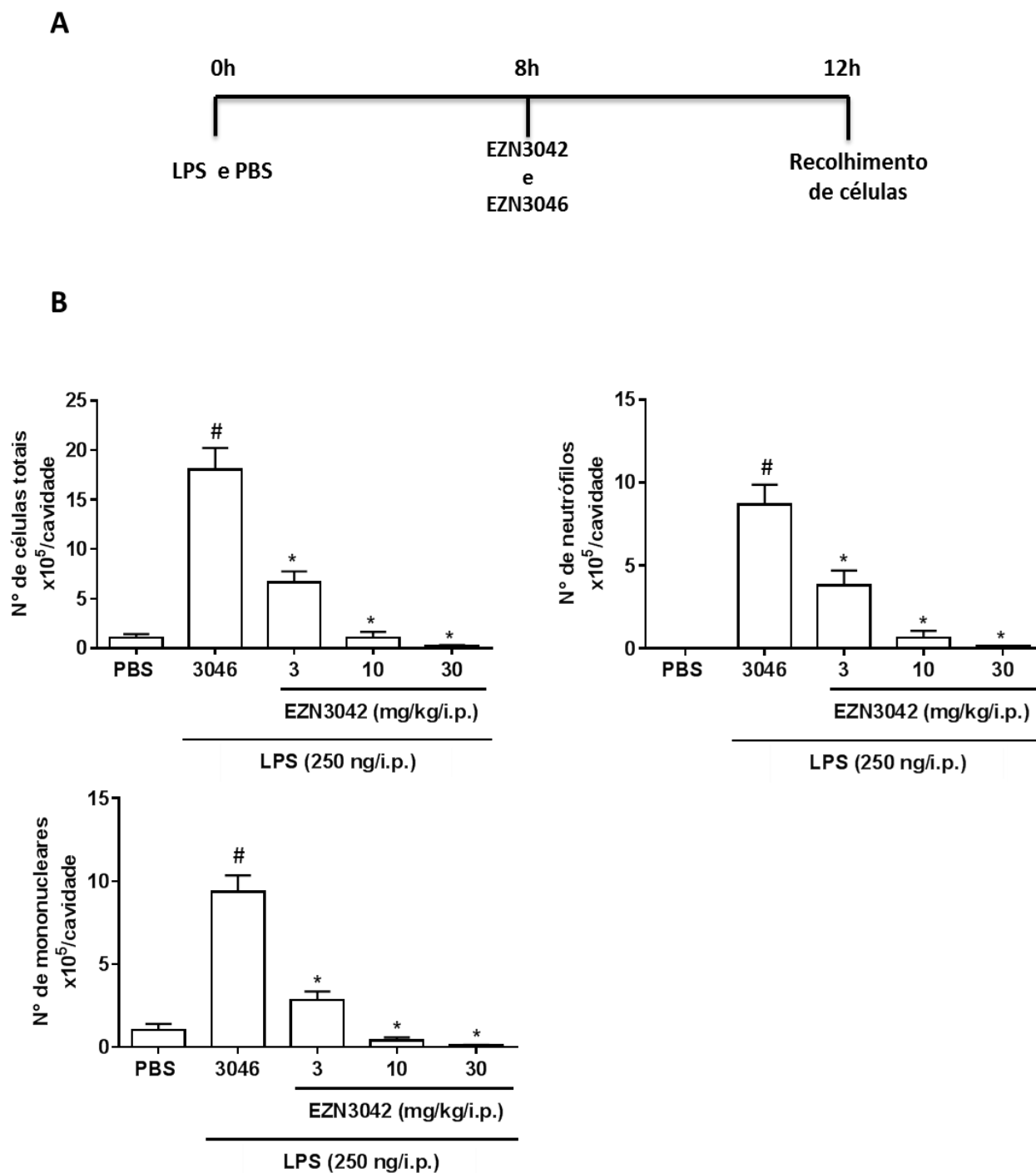


Figura 14. Tratamento de pleurisia aguda induzida por LPS com o anti-sense EZN3042.

O experimento ocorreu conforme representado em A: O LPS (250 ng/intrapleural – i.p.) foi injetado na cavidade intrapleural de camundongos e 8 horas após a injeção, no pico da inflamação, os animais foram tratados com 3 doses diferentes de EZN3042 (3, 10 e 30 mg/kg) e com seu controle (EZN3046/3046) na dose de 30 mg/kg. Após 4 horas de tratamentos, os animais (n=5 animais/grupo) foram eutanasiados e as células das cavidades pleurais foram removidas, contadas (Nº total de células – B) e submetidas à preparações de citolâminas. As células foram analisadas por um microscópio óptico de luz, das quais foram contados os mononucleares e neutrófilos (B). Os resultados foram representados como \pm EPM. *p<0,05 em relação controle (EZN3046.), #p<0,05 em relação ao PBS.

Primeiramente, é necessário que observemos se uma resposta inflamatória foi estabelecida. Como apresentado na figura anterior, o LPS foi capaz de aumentar o número de neutrófilos na cavidade pleural, caracterizando uma inflamação. Seguindo, então, nossas análises, observamos que o tratamento reduziu o número de células totais na cavidade pleural, reduziu o número de neutrófilos e o número de células mononucleares (Figura 13). Os resultados de apoptose e eferocitose foram negativos para todos os grupos e, portanto, não estão representados graficamente.

A apoptose e a eferocitose são processos muito rápidos para que não haja efeitos adversos ao organismo, assim montamos uma nova estratégia experimental (**Figura 15A**), capaz de identificar esses eventos. Desenvolvemos nossa nova estratégia baseada nos seguintes pontos: 1- O EZN3042 é um *antisense* e, portanto, capaz de inibir a transcrição de RNAm e não de inibir a proteína. Então, optamos pelo tempo de 4 horas para fazer o tratamento, no qual a expressão de survivina não foi significativamente elevada em relação ao PBS. É claro que o uso de tecnologias que nos demonstre o pico de expressão de RNAm para survivina, como um PCR quantitativo (qPCR), fosse o ideal para escolher o tempo de tratamento. Contudo, realizamos testes com 3 tipos diferentes de *primers* e não obtivemos sucesso na amplificação. Além disso, recolhemos as células 2 horas após o tratamento para que fosse possível identificar células apoptóticas e/ou eferocitadas. 2- Resolvemos incluir um grupo LPS para analisar se o controle do *antisense* (EZN3046) realmente não afeta os resultados. 3. Alteramos as doses utilizadas para 0,1, 1 e 3 mg/kg, já que as doses do experimento anterior reduziram significativamente o número de mononucleares. Nosso foco é induzir a apoptose de neutrófilos, mantendo os mononucleares viáveis, uma vez que os macrófagos são essenciais para o processo eferocítico. . É importante ressaltar que temos ciência que mais de um fator foi alterado nesse desenho experimental em relação ao anterior, como tempo de tratamento e dose. Após o tratamento com EZN3042 analisamos o número de células na cavidade pleural (**Figura 15B**), os eventos apoptóticos e eferocíticos (**Figura 16**).

).

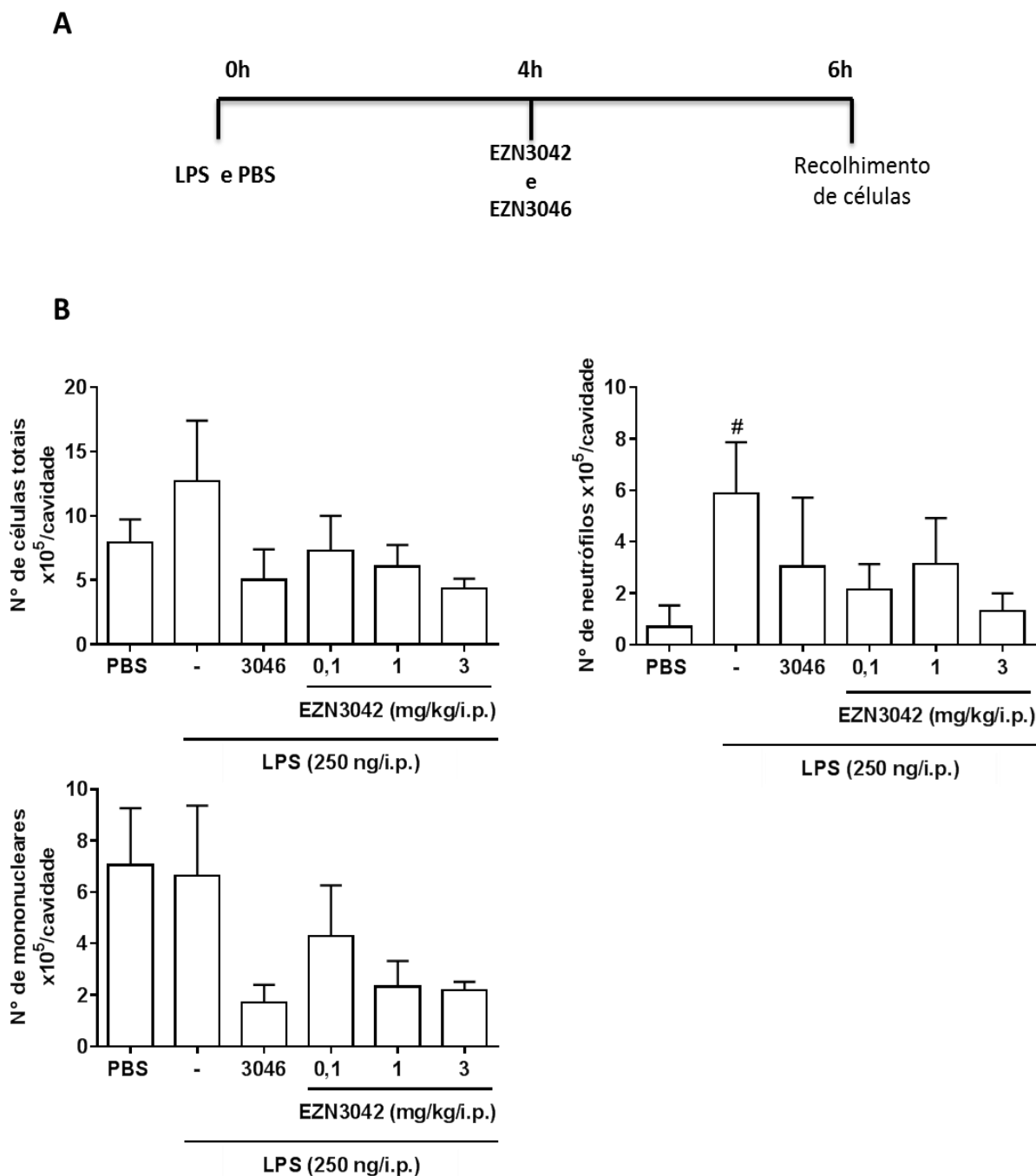


Figura 15. Tratamento de pleurisia aguda induzida por LPS com o *antisense* EZN3042 (doses 0,1, 1 e 3 mg/kg).

O experimento ocorreu conforme representado em **A**: O LPS (250 ng/intrapeural – i.p.) foi injetado na cavidade intrapeural de camundongos e 4 horas após a injeção, os animais foram tratados com 3 doses diferentes de EZN3042 (0,1, 1 e 3 mg/kg), com o controle da droga (EZN3046/3046) na dose de 3 mg/kg e um grupo recebeu PBS 1x (-). Após 2 horas de tratamentos, os animais (n=4 animais/grupo) foram eutanasiados e as células das cavidades pleurais foram removidas, contadas (Nº total de células - **B**) e submetidas à preparações de citolâminas. As células foram analisadas por um microscópio óptico de luz, das quais foram contados os mononucleares e neutrófilos (**B**). Os resultados foram representados como \pm EPM. #P<0,05 em relação ao PBS.

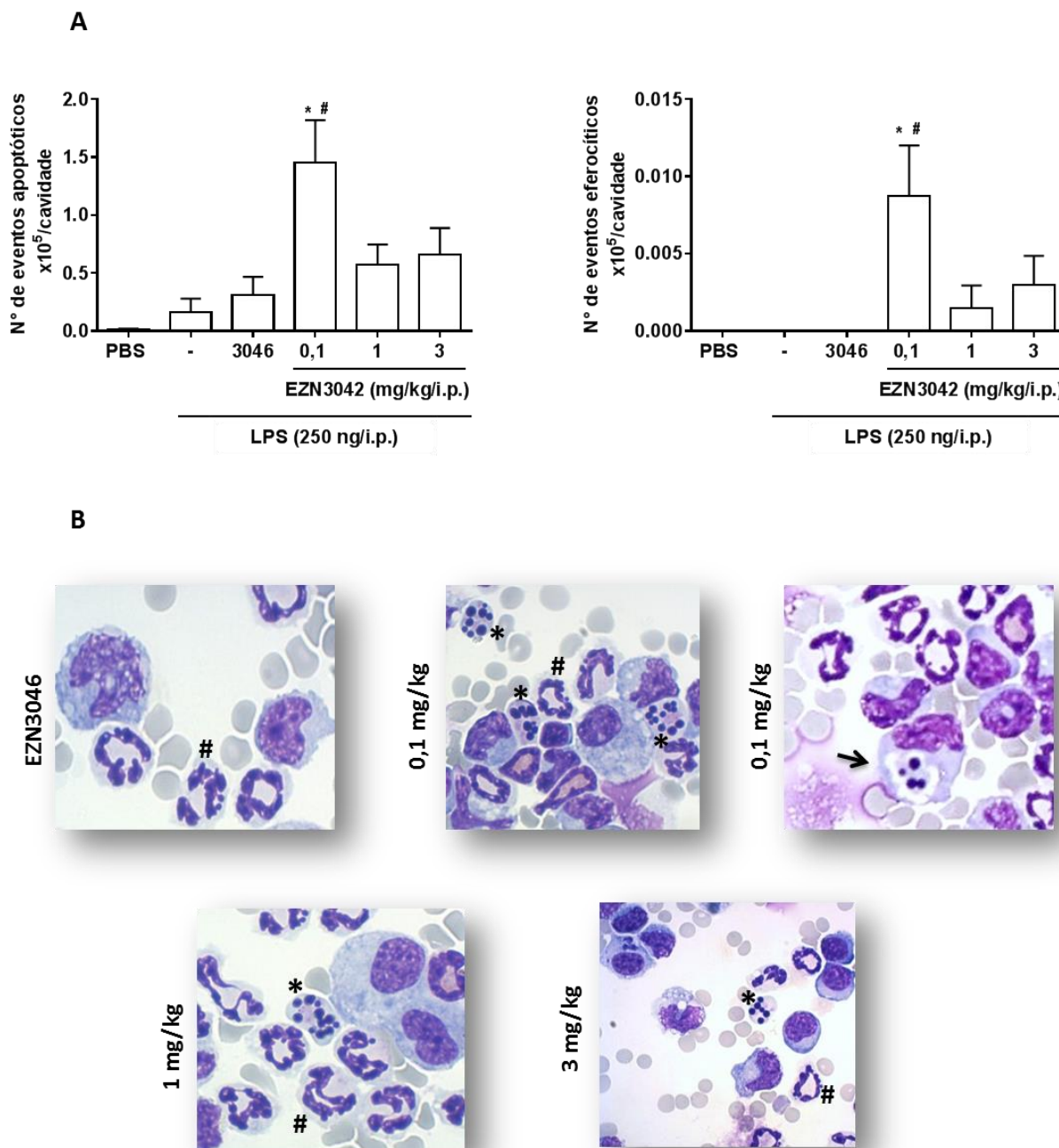


Figura 16. Efeitos do tratamento de EZN3042 na indução de apoptose e eferocitose durante uma pleurisia aguda induzida por LPS.

O LPS (250 ng/intrapeural – i.p.) foi injetado na cavidade intrapeural de camundongos e 4 horas após a injeção, os animais foram tratados com 3 doses diferentes de EZN3042 (0,1, 1 e 3 mg/kg), com o controle da droga (EZN3046/3046) na dose de 3 mg/kg e um grupo recebeu PBS 1x (-). Após 2 horas de tratamentos, os animais (n=4 animais/grupo) foram eutanasiados e as células das cavidades pleurais foram removidas, contadas e submetidas à preparações de citolâminas. As células foram analisadas por um microscópio óptico de luz, das quais foram contados os eventos apoptóticos e eferocíticos. **A:** N° de células apoptóticas e eferocíticas. **B:** Micrografias de citolâminas representando neutrófilos viáveis (#), células apoptóticas (*) e um evento de eferocitose por um macrófago (seta). Resultados representados como \pm EPM. *p<0,05 comparado ao grupo controle EZN3046. #P<0,05 comparado ao grupo veículo (-).

Como observado abaixo, na **Figura 15**, o tratamento com EZN3042 não alterou o número de células viáveis. Entretanto, o tratamento na menor dose utilizada, 0,1 mg/kg, aumentou a quantidade de apoptose e de eferocitose (**Figura 16**).

O próximo passo foi confirmar se os efeitos biológicos do tratamento com EZN3042 estavam associados com uma diminuição da expressão da survivina. Assim, realizamos um *Western Blot* de células recuperadas da cavidade pleural de animais tratados ou não com EZN3042 e observamos que a survivina é encontrada em células residentes da pleura e permanece expressa após a estimulação com LPS (**Figura 17**). Podemos observar ainda, que o tratamento com o EZN3042 reduziu a expressão de survivina nas três doses utilizadas comparado ao seu controle (EZN3046). Além disso, o tratamento com EZN3046 parece diminuir a expressão de survivina. Esse resultado precisa ser repetido, uma vez que não há a representação de um controle de integridade celular e degradação proteica, usualmente realizada pela detecção de expressão β -actina neste experimento.

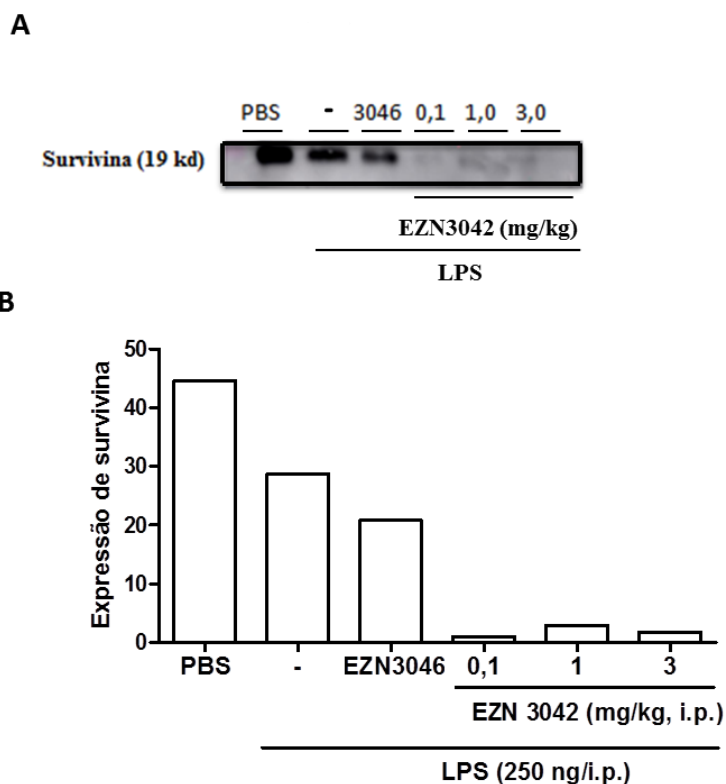


Figura 17. Efeito do tratamento do EZN3042 na expressão de survivina durante uma pleurisia aguda induzida por LPS.

O LPS (250 ng/intrapeural – i.p.) foi injetado na cavidade intrapeural de camundongos e 4 horas após a injeção, os animais foram tratados com 3 doses diferentes de EZN3042 (0,1, 1 e 3 mg/kg), com o controle da droga (EZN3046/3046) na dose de 3 mg/kg e um grupo recebeu PBS 1x (-). Após 2 horas de tratamentos, os animais foram eutanasiados e as células das cavidades pleurais foram recuperadas e agrupadas por grupos (n=4 animais/grupo). As células foram processadas e submetidas a uma análise de *Western Blot*, a qual demonstrou que a expressão de survivina é reduzida pelo tratamento com EZN3042 (**B e C**).

4.2. Estudo da survivina em inflamação induzida por MSU

Pensando em avaliar se o EZN3042 teria uma potencial ação como droga pró-resolutiva, avaliamos o seu efeito em uma inflamação aguda induzida por cristais de MSU. Inicialmente, analisamos se o tratamento com a droga afetaria a dor, um dos cinco sinais cardeais de alguns processos inflamatórios. Nesse sentido, nos embasamos no trabalho de Galvão e colaboradores (2017) e tratamos um grupo de animais estimulados com MSU no pico da inflamação (12 horas) e o comparamos com um grupo de animais não tratados com EZN3042. O desenho experimental está representado na **Figura 18A**.

Nosso resultado (**Figura 18B**) demonstram que o tratamento com EZN3042 foi capaz de reduzir a nocicepção articular causada pela resposta inflamatória induzida por cristais de MSU. O tratamento com o controle EZN3046 não foi realizado neste experimento.

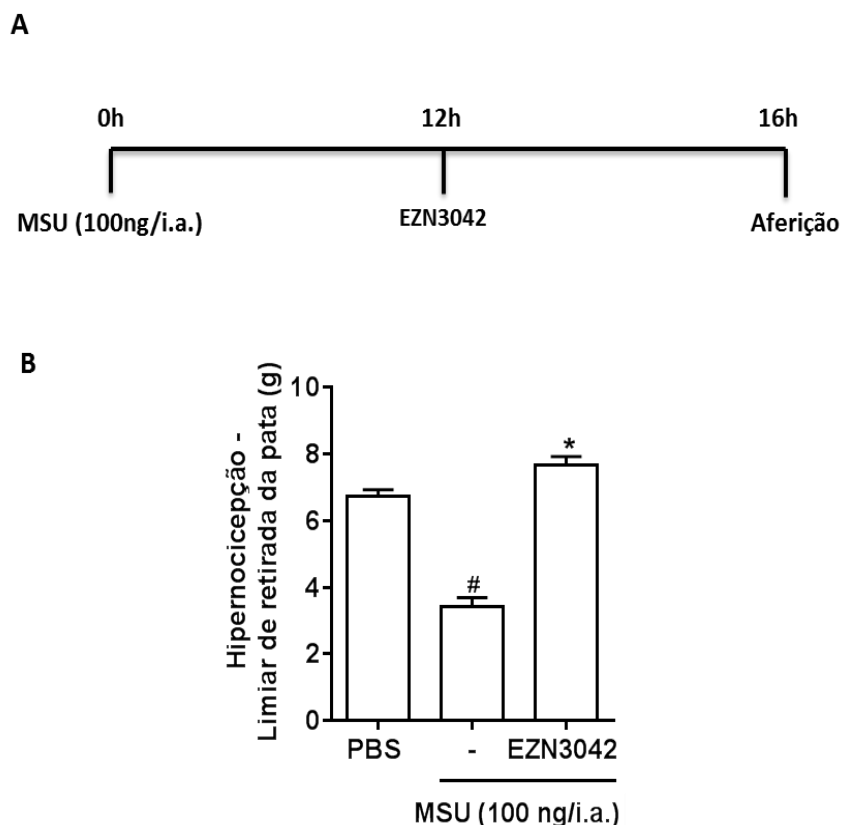


Figura 18. Efeito do EZN3042 na hipernocicepção articular de camundongos acometidos com inflamação aguda induzida por MSU.

Cristais de MSU foram injetados nas cavidades intrarticulares (i.a.) de camundongos, conforme em **A**, e após 12 horas de estimulação, os animais foram tratados com EZN3042 (0,1 mg/kg) na cavidade articular. Depois de 4 horas de tratamento, foi aferido o limiar de retirada da pata (g) representado em **B**. O resultado foi apresentado como \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo não tratado (-) e # $p < 0,05$ comparado ao PBS.

Visto que o EZN3042 na dose de 0,1 mg/kg reduz a hipernocicepção articular de murinos acometidos por inflamação induzida por MSU, nosso próximo passo foi analisar se essa redução estaria associada a eventos celulares da cavidade articular desses animais. Para isso, após a aferição de hipernocicepção, eutanásiamos os animais, lavamos as cavidades intrarticulares destes e preparamos citolâminas para verificar se o tratamento reduziu o número de células inflamatórias e induziu a apoptose celular. O desenho experimental está representado na **Figura 19A** e os resultados na **Figura 19B**.

Observamos que o desafio com MSU induz um aumento de células inflamatórias, como o número total de células, de neutrófilos e de mononucleares (**Figura 19B**). Além disso, o EZN3042 reduziu o número de células totais, de neutrófilos e de células mononucleares em 69,3 %, 70,4 % e 68,3 %, respectivamente, sem atingir significância estatística (**Figura 19B**). Talvez o que possa ter afetado nossa estatística seja o baixo n amostral, n=3 animais/grupo. Aqui, não encontramos eventos apoptóticos analisados morfológicamente nas células recuperadas no lavado intraarticular, portanto não representamos graficamente.

4.3. Análises *in vitro*: Cultura de neutrófilos humanos

O próximo passo foi investigar o papel da survivina na manutenção da sobrevivência de neutrófilos purificados, *in vitro*. Para isso, avaliamos dois pontos:

i: efeito da inibição da expressão da survivina, e;

ii: efeito do tratamento dos neutrófilos com survivina recombinante.

i. YM155 induz apoptose em neutrófilos humanos

Já foi descrito a presença de survivina em neutrófilos humanos (Altzner *et al.*, 2004), porém, seu papel para a sobrevivência ainda não foi elucidado. Primeiramente, estimulamos neutrófilos isolados do sangue periférico com LPS na concentração de 500ng/ml. Após uma hora de estimulação, foi adicionado o inibidor de survivina, YM155, na concentração de 100 nM por poço por 3 ou 6 horas. O YM155 aumentou a apoptose de neutrófilos humanos quando analisada bioquimicamente 3h após o tratamento (**Figura 20B**) ou morfológicamente 6h após o tratamento das células (**Figura 20C**).

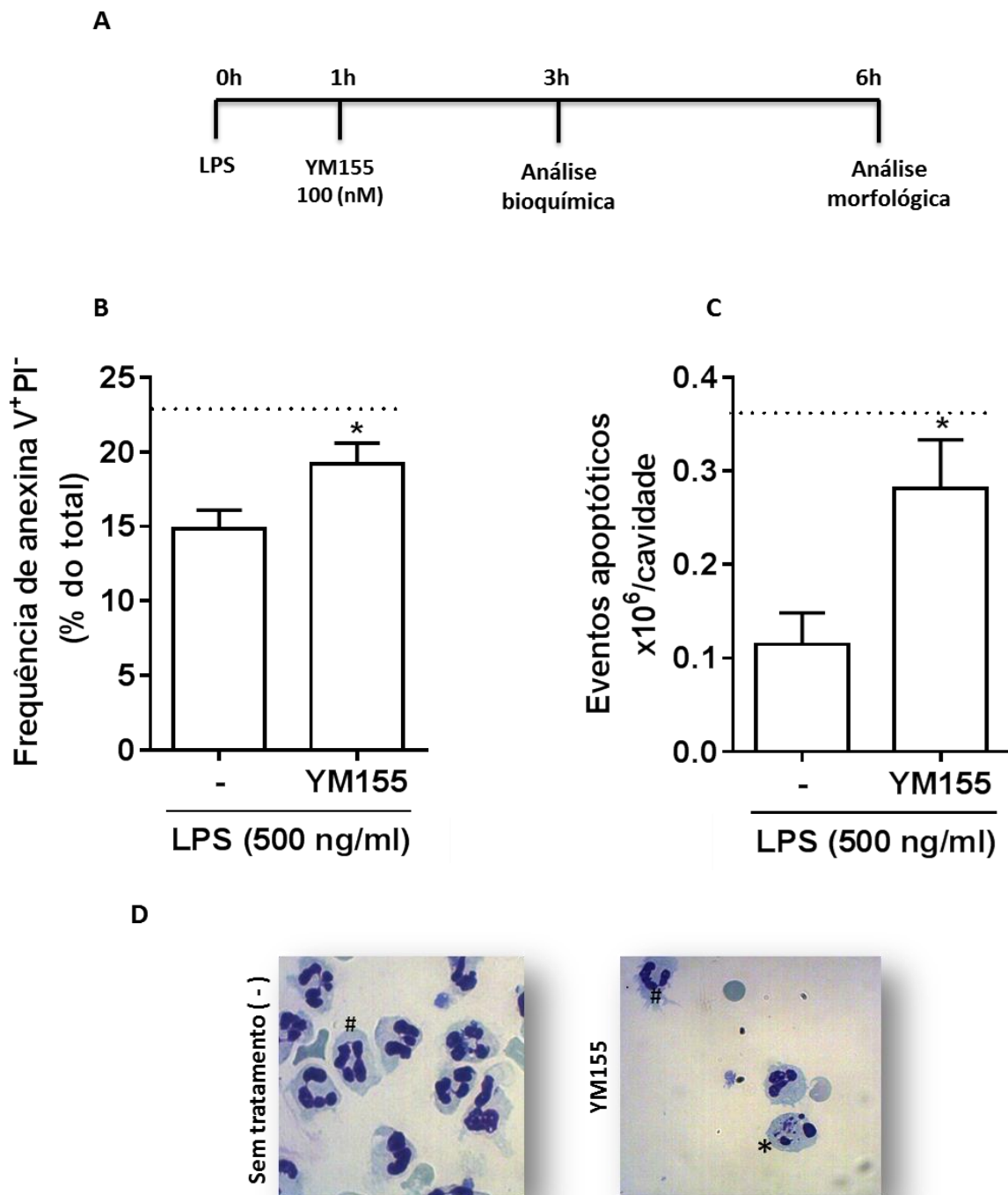


Figura 20. Efeito do YM155 na sobrevivência de neutrófilos humanos *in vitro*. O experimento foi conduzido conforme em **A**: Neutrófilos da circulação periférica de diferentes doadores foram isolados e cultivados em meio RPMI. Em seguida foi adicionado LPS (500ng/ml) nos grupos não tratados (-) e tratados (YM155). Após uma hora de estimulação, foi adicionado o YM155 (100 nM) que agiu por 3 horas ou 6 horas. Após 3 horas de tratamento as células dos referentes grupos foram submetidas à marcação celular de anexina V/PI e foram lidas em citômetro de fluxo. O resultado está representado em **B**. Depois de 6 horas de tratamento, as demais células dos referentes grupos foram usadas para as preparações de lâminas e submetidas à análise em um microscópio ótico, no qual células apoptóticas foram contadas. O resultado está representado em **C**. As micrografias referentes ao tratamento de 6 horas estão representadas em **D**, sendo o # a representação de um neutrófilo viável e o asterisco um neutrófilo apoptótico. Os resultados estão representados como \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado (-).

ii. *Survivina exógena não prolonga a sobrevivência de neutrófilos*

Uma vez que a inibição da expressão da survivina aumentou a apoptose de neutrófilos, estimulamos os neutrófilos humanos *in vitro* com a survivina recombinante (Abcam, Cambridge, USA). As células foram estimuladas em cultura por uma hora com LPS (500 ng/ml), adicionamos a survivina recombinante em duas concentrações (20 e 100 ng/ml) e analisamos a sobrevivência 18h e 20h após a adição da proteína. Os tempos escolhidos foram baseados no trabalho de (Rossi *et al.*, 2015), o qual demonstrou que os neutrófilos podem permanecer viáveis em cultura por até 20 horas. O resultado (**Figura 21**) demonstra que a survivina exógena não prolonga a sobrevivência de neutrófilos humanos em nenhuma das concentrações e em nenhum dos tempos analisados.

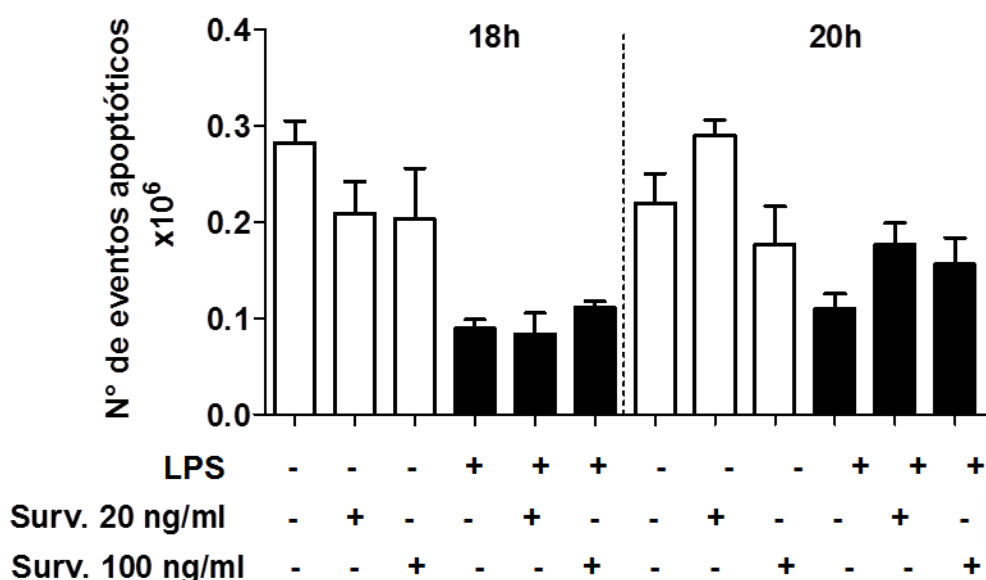


Figura 21. Efeito do tratamento de neutrófilos humanos com survivina recombinante *in vitro*.

Os neutrófilos humanos da circulação periférica foram isolados e cultivados em meio RPMI. Em seguida as células foram estimuladas com LPS (500ng/ml) e após uma hora, a survivina recombinante foi adicionada nas concentrações de 20ng/ml ou 100 ng/ml. As células foram mantidas em ambiente controlado por 18 horas ou 20 horas e então submetidas à preparações de lâminas para a análise de neutrófilos apoptóticos. Os resultados estão representados como \pm EPM.

5. DISCUSSÃO

Os fenômenos de resolução da resposta inflamatória são imperativos para que haja controle da inflamação e retorno a homeostase tecidual (Alessandri *et al.*, 2013). Este trabalho demonstrou que a inibição farmacológica de survivina contribui para eventos resolutivos como: 1. Redução de leucócitos viáveis; 2- Indução de células apoptóticas, 3- Redução da dor associada à inflamação, e 4. Indução de eferocitose. Somados, esses eventos mostram que a survivina pode ser uma via de controle da sobrevivência de neutrófilos e um potencial alvo terapêutico para doenças inflamatórias.

Os neutrófilos recrutados para o tecido inflamado desempenham um papel fundamental na liberação de mediadores inflamatórios e na remoção do agente/estímulo inflamatório (Sugimoto *et al.*, 2016). No entanto, eles podem ser iniciadores de diversas patologias, incluindo inflamação crônica e doenças autoimunes (Fox *et al.*, 2016). Desta forma, reduzir o número dessas células durante uma inflamação pode ser uma estratégia de controle inflamatório. Esse trabalho mostrou que o inibidor da produção de survivina no pico da resposta inflamatória reduziu a quantidade de neutrófilos viáveis na cavidade pleural e articular. Uma hipótese que justifica essa redução é a indução de apoptose dessas células. Os neutrófilos apresentam uma vida útil curta (6 a 12 horas na circulação periférica), mas sob a influência de sinais de adesão, transmigração, hipóxia, citocinas e produtos microbianos, como o LPS, essa vida útil pode ser prolongada (Colotta *et al.*, 1992). O LPS, por exemplo, estímulo que utilizamos nos experimentos de pleurisia aguda e cultura de neutrófilos, prolonga a sobrevivência celular pela via PI3K/Akt (Hachiya *et al.*, 1995; Sousa *et al.*, 2010). Logo, a redução do número de neutrófilos viáveis induzida por um inibidor de survivina pode estar relacionada à via PI3K/AKT e alguns estudos sustentam essa hipótese: Tang e colaboradores (2009), estudaram o ácido ursólico, um potente anticancerígeno *in vitro*, que atua em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e mostraram que a apoptose induzida pelo composto reduz a expressão de PI3K, p-Akt e de survivina. Zhao e colaboradores (2010) investigaram a relação entre a expressão de survivina induzida por PI3K ativa (v-P3K) em fibroblastos embrionários de galinha e mostraram que PI3K aumenta a expressão de survivina pela ativação de AKT. Em conjunto, esses dados apontam que pode existir uma relação entre a expressão de survivina e PI3K, que precisa ser confirmada neste trabalho por análises complementares.

A apoptose de neutrófilos é um elemento fundamental para a resolução da inflamação por mediar processos fundamentais para o fim da resposta inflamatória, como a interrupção do influxo de neutrófilos, a limitação do dano tecidual e indução de reprogramação de macrófagos (Alessandri *et al.*, 2013). Mostramos que os inibidores que utilizamos foram capazes de induzir a apoptose, porém, os mecanismos que relaciona a survivina com a morte celular programada ainda são discutidos. A via de sinalização mais aceita até então é a atuação indireta da survivina à caspases, por meio de uma interação IAP-IAP com a X-IAP (Altieri, 2010). Dados bioquímicos sugerem que os resíduos de BIR de survivina se associam a sítios descontínuos de BIR1 e BIR3 da XIAP (Dohi *et al.*, 2004; Dohi *et al.*, 2007) e essa interação confere uma estabilidade à X-IAP contra uma degradação dependente de ubiquitinação, aumentando, portanto, sua ação inibitória sobre as caspases (Altieri, 2010). Nesse contexto, ao reduzir a expressão de survivina com o EZN3042 e o YM155, as moléculas X-IAP podem ter ficado com uma estabilidade comprometida, interferindo na sua atuação nas caspases e, portanto, resultando em uma vulnerabilidade da célula sofrer apoptose. Outros mecanismos de ação da survivina estão sendo propostos (Song *et al.*, 2003; McNeish *et al.*, 2005; Ceballos-Cancino *et al.*, 2007), mas suas implicações funcionais ainda não foram claramente definidas. Portanto, para investigarmos se esse mecanismo estaria por trás da apoptose de neutrófilos é necessário realizar uma análise da expressão e clivagem de caspases, incluindo a caspase 3 e outras moléculas da via de morte celular.

Considerando que a survivina é uma proteína que prolonga a vida útil celular por regular vias pró-apoptóticas (Altieri, 2010; Ceballos-Cancino *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009) a redução da expressão da mesma durante uma resposta inflamatória pode estar associada à indução de apoptose de neutrófilos. Essa hipótese é parcialmente sustentada por Kolaczowska e colaboradores (2010), que demonstraram a expressão significativa de elementos iniciadores de apoptose, como a caspase 8 e 9, quatro horas após a indução de uma peritonite por carragenina. Gilroy e colaboradores (2003) demonstraram também que macrófagos sofrem apoptose a partir de 48h de estimulação por zymosan na cavidade peritoneal de murinos. Outros estudos conduzidos com outros reguladores de apoptose (mcl-1 e BAX/BAD), também demonstram uma oscilação na expressão dessas moléculas em células inflamatórias (Moulding *et al.*, 1989; Moulding *et al.*, 2000; Hamasaki *et al.*, 1998; Leuenroth *et al.*, 2000; Epling-Burnette *et al.*, 2001). Contudo, é necessária uma análise de sinalizadores de morte celular em um estudo temporal para corroborar essas hipóteses. Essa parte deve estar na parte de explicação da apoptose

A eferocitose procede à resolução da inflamação por eliminar as células apoptóticas no tecido inflamado, contribuindo para o retorno da homeostase tecidual (Sugimoto *et al.*, 2016). Aqui, mostramos que o tratamento com EZN3042 foi capaz de aumentar o número de eventos eferocíticos. Esse aumento pode ser consequência do número aumentado de neutrófilos apoptóticos induzidos pelo EZN3042 ou ainda ser resultado da ação de mediadores pró-resolutivos, como autacoides, peptídeos MSH e anexina A1. Os neutrófilos apoptóticos expressam sinais *find me*, como a lisofosfatidilcolina (LPC), esfingosina 1-fosfato (S1P), fractalquina e nucleotídeos ATP e UTP que direcionam os macrófagos a se aproximarem para fagocitá-los por meio do reconhecimento de sinais *eat me*, como a fosfatidilserina. Assim, essa sinalização garante que células apoptóticas sejam efetivamente removidas do tecido (Martin *et al.*, 2014; Ortega-Gómez *et al.*, 2013; Alessandri *et al.*, 2013). Além disso, os granulócitos apoptóticos liberam anexina A1, um importante mediador pró-resolutivo capaz de acelerar a depuração de granulócitos apoptóticos (Vago *et al.*, 2012. Scanell *et al.*, 2007). Em conjunto, esses eventos podem ter sido os propulsores para o aumento de eventos eferocíticos que demonstramos. Essa hipótese precisa ser estudada com detalhes e outros ensaios precisam ser desenvolvidos para esclarecer o possível mecanismo por trás desse dado. Esse resultado, juntamente com os anteriores, mostra a potencialidade dos inibidores de survivina em serem alvos de tratamento inflamatório pró-resolutivo.

A inflamação gotosa aguda é uma condição extremamente dolorosa, provocada pela ativação de múltiplos mediadores inflamatórios e está associada a manifestações de sintomas clínicos sistêmicos, como febre e níveis elevados de leucocitose na fase aguda (Mitroulis *et al.*, 2013). Nosso estudo demonstrou que a aplicação de EZN3042 em camundongos acometidos por gota induzida por MSU reduz a hipernocicepção articular e essa redução pode estar associada à redução de leucócitos no sítio inflamatório. O ácido úrico precipitado na forma de cristais nas articulações induz a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α por monócitos e macrófagos. A IL-1 β é a principal citocina inflamatória estudada na gota e está estritamente relacionada com a dor inflamatória. Essa citocina ativa as prostaglandinas, que induzem a produção de aminas simpáticas e estas, por sua vez, sensibilizam neurônios nociceptivos promovendo a dor (Finisguerra *et al.*, 2015; Ruiz-Miyazawa *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2005). Assim, ao afetar a viabilidade de células inflamatórias, os inibidores de survivina podem intervir indiretamente sobre a hipernocicepção, contribuindo para quadros de doenças inflamatórias associadas à dor.

Por fim, nosso estudo mostrou que a survivina exógena não apresenta uma ação de sobrevivência celular. Realizamos esse estudo baseado nos estudos publicados na última década, que têm detectado a survivina no líquido sinovial de joelhos de pacientes artríticos (Ebrahimiyan *et al.*, 2018). A ausência de um efeito exógeno levantou, então, duas hipóteses para estudo: 1. o resultado negativo foi devido a falta de um agente transfectador, como um exossoma, capaz de carrear a survivina através da membrana plasmática e 2. a survivina extracelular pode desempenhar um papel alternativo, como a reprogramação de macrófagos, dependente de microvesículas. Consistente com a primeira hipótese, Khan e colaboradores (2009), demonstraram que as survivinas recombinantes (Surv-WT e Surv-T34A) foram incapazes de afetar os eventos apoptóticos em células imortalizadas HeLa. Em relação à segunda hipótese, Marwick e colaboradores (2018) e Rhys e colaboradores (2018) mostraram que microvesículas liberadas por neutrófilos são capazes de modular um perfil inflamatório de macrófagos para um perfil anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo*. Visto que é descrito a presença de survivina em vesículas liberadas por exossomas livres (Khan *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2015), talvez a survivina seja um dos componentes dessas microvesículas liberadas por neutrófilos capaz de contribuir para a reprogramação de macrófagos. De início, é necessário realizar novos ensaios usando microvesículas como transfectador e, na ausência de uma resposta, progredir para outros ensaios que explorem um papel secundário da proteína.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que a survivina pode ser um possível alvo de terapias pró-resolutivas e um protagonista importante na sobrevivência de neutrófilos durante a inflamação.

6. CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstrou que a survivina é uma molécula moduladora da sobrevivência de neutrófilos e um potencial alvo pró-resolutivo.

7. PERSPECTIVAS

1. Realizar um estudo temporal de sinalizadores de morte durante uma inflamação aguda para associá-lo com nossa cinética de expressão de survivina.
2. Analisar a participação de PI3K/AKT e a expressão de caspase 3 em células de lavado pleural no modelo de pleurisia aguda induzida LPS e em neutrófilos humanos, a fim de avaliar a relação dessas vias com a survivina.
3. Avaliar a presença de survivina em microvesículas derivadas de neutrófilos e macrófagos humanos.

4. REFERÊNCIAS

Abbas, A. K., Fausto, N., Kumar, V. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Editora Elsevier*, pp. 1504, 2010.

Alessandri, A. L., Sousa, L. P., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Pinho, V., Teixeira, M. M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*. 139, 189–21, 2013.

Allendorf D. J., Yan J., Ross G. D., Hansen R. D., Baran J. T., Subbarao K., Wang L., Haribabu B. C5a-mediated leukotriene B4-amplified neutrophil chemotaxis is essential in tumor immunotherapy facilitated by anti-tumor monoclonal antibody and beta-glucan. *J Immunol*. P. 7050-7056, 2005.

Altieri D. C. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J*. p. 199-205, 2010.

Altzner F., Martinelli S., Yousefi S., Thurig C., Schmid I., Conway E. M., Schoni M. H., Vogt P., Mueller C., Fey M.F., Zangemeister -Wittke U., Simon H. U. Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J Exp Med.*, p. 1343–1354, 2004.

Epling-Burnette P. K., Zhong B., Bai F., Jiang K., Bailey R. D., Garcia R., Jove R., Djeu J. Y., Loughran T. P. Jr, Wei S. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J Immunol*. P. 7486-95, 2001.

Leuenroth, S. J., Grutkoski, P. S., Ayala, A., and Simms, H. H. Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. *Surgery* 128, 171–177, 2000.

Hamasaki, A., Sendo, F., Nakayama, K., Ishida, N., Negishi, I., Nakayama, K., et al. Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J. Exp. Med.* 188, 1985–1998.

Moulding, D. A., Giles, R. V., Spiller, D. G., White, M. R., Tidd, D. M., and Edwards, S. W. (2000). Apoptosis is rapidly triggered by antisense depletion of MCL-1 in differentiating U937 cells. *Blood* 96, 1756–1763

Amaral, F. A., Costa, V. V., Tavares, L. D., Sachs, D., Coelho, F. M., Fagundes, C. T., Soriani, F. M., Silveira, T. N., Cunha, L. D., Zamboni, D. S., Quesniaux, V., Peres, R. S., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., Ryffel, B., Souza, D. G. and Teixeira, M. M., NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis Rheum*, 64: 474-484, 2012.

Ariel, A., Serhan, C. N. New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. *Front Immunol*, 3: 1-6, 2012.

Astakhova, I. K., Hansen, L. H., Vesterb, B., Wengel J. Peptide–LNA oligonucleotide conjugates. *Org. Biomol. Chem.*, 4240-4249, 2013.

Barroso L. C., Magalhaes G. S., Galvão I. Reis A. C., Souza D. G., Sousa L. P.5 Santos R. A. S., Campagnole-Santos M. J., Pinho V., Teixeira M. M. Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Neutrophilic Inflammation in a Model of Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Front Immunol.*, P. 1-11, 2017.

Bokarewa M., Lindblad S., Bokarew D., Tarkowski A. Balance between survivin, a key member of the apoptosis inhibitor family, and its specific antibodies determines erosivity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 349-358, 2005.

Brandau, S. et al. Jakob M., Hemeda H., Bruderek K., Janeschik S., Bootz F., Lang S. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J. Leukoc. Biol.*p. 1005–1015, 2010.

Burne M. J., Elghandour A., Haq M., Saba S. R., Norman J., Condon T., Bennett F., Rabb H. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *Jornal leuk. bio.*, p. 192-198, 2001.

Cash J. L., Bena S., Headland S. E., McArthur S., Brancialeone V., Perretti M. Chemerin15 inhibits neutrophil-mediated vascular inflammation and myocardial ischemia-reperfusion injury through ChemR23. *EMBO Rep.*, p. 999–1007, 2013.

Cash J. L., Christian A. R., Greaves D. R. Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner. *J Immunol.*, p. 5315–5324, 2010.

Cassatella, M. A. Mosna F., Micheletti A., Lisi V., Tamassia N., Cont C., Calzetti F., Pelletier M., Pizzolo G., Krampera M. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells.*, p. 1001–1011, 2011.

Ceballos-Cancino G., Espinosa M., Maldonado V., Melendez-Zajgla J. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene*, p. 7569–757, 2007.

Chen X., Duan N., Zhang C., Zhang W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer*. p. 314-23, 2016.

Cheng Q., Ling X., Haller A., Nakahara T., Yamanaka K., Kita A., . Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. *Int J Biochem Mol Biol.* 2012;3:179–197.

Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S. Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, p. 2012–2020, 1992.

Cooray S. N., Gobetti T., Montero-Melendez T., McArthur S., Thompson D., Clark A. J., Flower R. J., Perretti M. Ligand-specific conformational change of the G-protein-coupled receptor ALX/FPR2 determines proresolving functional responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, p. 18232–18237, 2013.

Cotran, R. S., Kumar, V., & Collins, T. (Eds.). *Robbins Pathologic Basis of Disease* (6th ed.). Philadelphia: WB Saunders Co., 1999.

Crececius A. R., Luckasen G. J., Larson D. G., Dinenna F. A. KIR channel activation contributes to onset and steady-state exercise hyperemia in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, p. 82–91, 2014.

Cunha T. M., Verri W. A. Jr, Silva J. S., Poole S., Cunha F. Q., Ferreira S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings the National Academy Sciences USA*, p. 1755–1760, 2005.

Dalli J., Serhan C. N. Pro-Resolving Mediators in Regulating and Conferring Macrophage Function. *Front Immunol.* P. 1-8, 2017.

Dalli, J., Consalvo, A. P., Ray, V., Di Filippo, C., D'Amico, M., Mehta, N. and Perretti, M., Proresolving and tissue-protective actions of annexin A1-based cleavage-resistant peptides are mediated by formyl peptidoreceptor 2/lipoxin A4 receptor. *J. Immunol.* 190: 6478–6487, 2013.

Dean R.A., Cox J.H., Bellac C.L., Doucet A., Starr A.E., Overall C.M. Macrophage specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112:3455–64, 2008.

Debret R., El Btaouri H., Duca L., Rahman I., Radke S., Hays B., Sallenave J.M., Antonicelli F. Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. *FEBS Lett*, p. 195–202, 2003.

Delgado R., Carlin A., Airaghi L., Demitri M.T., Meda L., Galimberti D., Baron P., Lipton J. M., Catania A. Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J Leukoc Biol.* p.740–745, 1998.

Dohi T., Okada K., Xia F., Wilford C. E., Samuel T., Welsh K., Marusawa H., Zou H., Armstrong R., Matsuzawa S., Salvesen G. S., Reed J. C., Altieri D. C. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem.* 34087–34090, 2004.

Dohi T., Xia F., Altieri D. C. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell.*, p. 17–28, 2007.

Duffin R., Leitch A. E., Fox S., Haslett C., Rossi A. G. Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunol Rev.* p. 28-40, 2010.

Ebrahimiyan H., Aslani S., Rezaei N., Jamshidi A., Mahmoudi M. Survivin and autoimmunity; the ins and outs. *Immunol Lett.*, p. 14-24, 2018.

El Kebir D., Gjorstrup P., Filep, J. G. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, P. 14983–14988, 2012.

Fenstermaker R. A., Figel S. A., Qiu J., Barone T. A., Dharma S. S., Winograd E. K., Galbo P. M., Wiltsie L. M., Ciesielski M. J. Survivin Monoclonal Antibodies Detect Survivin Cell Surface Expression and Inhibit Tumor Growth In Vivo. *Clin Cancer Res.*, p. 2642-2652, 2018.

Ferrari L., Silva , Alves-Filho J. C, Cunha T. M., Cunha F. Q., Casagrande R., Waldiceu Jr. A. V. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF- κ B *Chemico-Biological Interactions*, p.9–17, 2015.

Filippi, M. D. Leukocyte transcellular diapedesis: Rap1b is in control. *Tissue Barriers* 1-8, 2015.

Finisguerra V., Conza G., Matteo M., Serneels J., Costa S., Thompson A. A. R., Wauters E., Walmsley S., Prenen H., Granot Z., Casazza A., Mazzone M. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Europe PMC Funders Group*, p.349-53, 2015.

Fox S., Leitch A. E., Duffin R., Haslett C., Rossi A. G. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* P. 216-27, 2010.

Fullerton, J. N. e Gilroy, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 15:551-567, 2016.

Galvão, I.G., Barroso, L. C., Tavares, L. P., Queiroz-Junior, C. M., Costa, V. V., Carneiro, F. S., Ferreira, T. P., Silva, P. M. R., Amaral, F. A., Sousa, L. P., Teixeira, M. M. Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. *European journal of immunology*, 47: 595-586, 2017.

Garg H., Suri P., Gupta J. C., Talwar G.P., Dubey S. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int* 16:1-14, 2016.

Gastardelo T.S., Damazo A.S., Dalli J., Flower R.J., Perretti M., Oliani S.M. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation, *Am. J. Pathol.*, p.177–183, 2009.

Giaccone G., Zatloukal P., Roubec J., Floor K., Musil J., Kuta M., van Klaveren R. J., Chaudhary S., Gunther A., Shamsili S. Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 4481-4486, 2009.

Gilroy D .W., Colville-Nash P. R., McMaster S., Sawatzky D. A., Willoughby D. A., Lawrence T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy (Delta) 12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J.*, p. 2269-2271, 2003.

Gilroy D., De Maeyer R. New insights into the resolution of inflammation. *Semin Immunol.*,p.161-168, 2015.

Gonçalves W. A., A. C. R. Melão, Teixeira, M. M., Rezende B. M., Pinho V. Pro-resolving Mediators. *Immunopharmacology and Inflammation.* P. 133-175, 2018.

Gravina G., Wasén C., Garcia-Bonete M. J., Turkkila M., Erlandsson M. C., Töyrä Silfverswärd S., Brisslert M., Pullerits R., Andersson K. M., Katona G., Bokarewa M. I. Survivin in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.*p. 845-855, 2017.

Hachiya O., Takeda Y., Miyata H., Watanabe H., Yamashita T., Sendo F. Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiol Immunol*, p. 39:715-723, 1995.

Hasegawa T., Suzuki K., Sakamoto C., Ohta K., Nishiki S., Hino M., Tatsumi N., Kitagawa S. Expression of the inhibitor of apoptosis (IAP) family members in human neutrophils: upregulation of cIAP2 by granulocyte colony-stimulating factor and overexpression of cIAP2 in chronic neutrophilic leukemia. *Blood*, p. 1164–1171, 2003.

Headland S.E.,Norling L.V.The resolution of inflammation: Principles and challenges, *Semin Immunol*, 2015.

Hirsch E., Katanaev V. L., Garlanda C., Azzolino O., Pirola L., Silengo L., Sozzani S., Mantovani A., Altruda F., Wymann M. P. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science.* p. 1049-1053, 2000.

Hu H., Shikama Y., Matsuoka I., Kimura J. Terminally differentiated neutrophils predominantly express Survivin-2 α , a dominant-negative isoform of Survivin. *Journal of Leukocyte Biology*, 83: 393-400, 2008.

Ieda, F., Moreno, B., Martin, J. S., Bonetti, Y. W. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev. Brasileira de cirurgia cardiovascular* 25:4, 575-584, 2010.

Impellizzeri D, Mazzon E, Esposito E, Paterniti I, Bramanti P, et al.. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, in the inflammatory process induced by an experimental model of spinal cord injury. *Free Radic Res.*, P. 221-236, 2011.

Kaneva M. K., Kerrigan M. J., Grieco P., Curley G. P., Locke I. C., Getting S. J. Chondroprotective and anti-inflammatory role of melanocortin peptides in TNF-alpha activated human C-20/A4 chondrocytes. *Br J Pharmacol*, p. 67–79, 2012.

Khan S., Aspe J. R., Asumen M. G., Almaguel F., Odumosu O., Acevedo-Martinez S., De Leon M., Langridge W. H. R., Wall N. R. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer.*, 1073–1086, 2009.

Khan S., Bennit H. F., Wall N. R. The emerging role of exosomes in survivin secretion. *Histol Histopathol.*, p. 43-50, 2015.

Khan S., Jutzy J. M., Aspe J. R., McGregor D. W., Neidigh J. W., Wall N. R. Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis*, p. 1-12, 2011.

Kolaczowska E., Koziol A., Plytycz B., Arnold B. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. *Immunobiology.*, p. 492-504, 2010.

Kotas M. E., Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell.*, p. 816-827, 2015.

Kumar S., Birge R. B. Efferocytosis. *Curr Biol*. P. 558-559, 2016.

Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Aster, Jon C.: Robbins. Patologia Básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.928, 2013.

Leliefeld P. H. C., Wessels C. M., Leenen L. P. H., Koenderman L., Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical Care.*, p. 1-9, 2016.

Levy B.D., Bonnans C., Silverman E.S., Palmer L.J., Marigowda G., Israel E. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*, p.824–830, 2005.

Lewis K. D., Samlowski W., Ward J., Catlett J., Cranmer L., Kirkwood J., Lawson D., Whitman E., Gonzalez R. A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Invest New Drugs.* P. 161-166, 2011.

Li Y., Cai L., Wang H., Wu P., Gu W., Chen Y., Hao H., Tang K., Yi P., Liu M., Miao S., Ye D. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene*, p. 3887–3899, 2011.

Li Z., Jiang H., Xie W., Zhang Z., Smrcka A.V., Wu D. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science.* 1046-1049, 2000.

Lima K. M., Vago J. P., Caux T. R., Negreiros-Lima G. L., Sugimoto M. A., Tavares L. P., Arribada R. G., Carmo A. A. F., Galvão I., Costa B. R. C., Soriani F. M., Pinho V., Solito E., Perretti M., Teixeira M. M., Sousa L. P. The resolution of acute Inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1. *J Biol Chem.*, p. 2017.

Lumbroso D., Soboh S., Maimon A., Schif-Zuckl S., Ariel A., Burstyn-Cohen T. Macrophage-Derived Protein S Facilitates Apoptotic Polymorphonuclear Cell Clearance by Resolution Phase Macrophages and Supports Their Reprogramming. *Front. Immuno*, 9:1-10, 2018.

Luthringer, B., Isbert, S., Muller, W.E.G., Zilberberg, C., Thakur, N. L., Worheide, G., Stauber, R. H., Kelve, M., Wiens, M. Poriferansurvivin exhibits a conserved regulatory role in the interconnected pathways of cell cycle and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18, 201-213, 2011.

Magalhaes G. S., Barroso L. C., Reis A. C., Rodrigues-Machado M. G., Gregório J. F., Motta-Santos D., Oliveira A. C., Perez D. A., Barcelos L. S., Teixeira M. M., Santos R. A. S., Pinho V., Campagnole-Santos M. J. Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma. P. *Front Immunol.*, p. 1-10, 2018.

Mariani F., Roncucci L. Chemerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society et al.* p.85–95, 2015.

Martin C. J., Peters K. N., Behar S. M. Macrophages Clean Up: Efferocytosis and Microbial Control. *Curr Opin Microbiol*, 17-23, 2014.

Martinon F., Pétrilli V., Mayor A., Tardivel A., Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, p. 237-241, 2006.

Marwick J. A. Mills R., Kay O., Michail K., Stephen J., Rossi A. G., Dransfield I., Hirani N. Neutrophils induce macrophage anti-inflammatory reprogramming by suppressing NF- κ B activation. *Cell Death Dis.* P. 1-13, 2018.

Marwick J. A., Mills R., Kay O., Michail K., Stephen J., Rossi A. G., Dransfield I., Hiran N. Neutrophils induce macrophage antiinflammatory reprogramming by suppressing NF-Kb activation *Cell Death and Disease*, P. 1-13, 2018.

McDonald B., Kubes P. Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation. *Toxicol Pathol.*, p. 157-165, 2012.

McNeish I. A., Lopes R., Bell S. J., McKay T. R., Fernandez M., Lockley M., Wheatley S. P., Lemoine N. R. Survivin interacts with Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells but is redundant in Smac-mediated apoptosis. *Exp Cell Res.* 69–82, 2005.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.*, p. 428-435, 2008.

Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 771-776, 2010.

Mera S., Magnusson M., Tarkowski A., Bokarewa M. Extracellular survivin up-regulates adhesion molecules on the surface of leukocytes changing their reactivity pattern. *J Leukoc Biol.*, p. 149–155, 2008.

Mitroulis I., Kambas K., Ritis K. Neutrophils, IL-1 β , and gout: is there a link? *Semin Immunopathol.* P. 501-512, 2013.

Moulding, D. A., Qayle, J. A., Hart, C. A., and Edwards, S. W. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* 92, 2495–2502., 1989.

Necochea-Campiona R., Osterman C. J. D., Hsu H. W., Fan J., Mirshahidi S., Wall N. R., Chen, C. S.. AML sensitivity to YM155 is modulated through AKT and Mcl-1. *Cancer Lett.*, p. 44-51, 2015.

Newson J., Stables M., Karra E., Arce-Vargas F., Quezada S., Motwani M., Mack M., Yona S., Audzevich T. Gilroy D. W. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*, p. 1748-1764, 2014.

Nibbs R. J., Graham G. J. Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nat Rev Immunol.*, p. 815–829, 2013.

Niki T., Tsutsui S., Hirose S., Aradono S., Sugimoto Y., Takeshita K., Nishi N., Hirashima M. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem*, p. 32344–32352, 2009.

Norling L. V., Sampaio A. L., Cooper D, Perretti M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking, *FASEB J.*, p. 682–690, 2008.

Nourshargh S., Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues *Immunity*. P. :694-707, 2014.

Nourshargh, S. e Voisin M. B. Neutrophil Transmigration: Emergence of an Adhesive Cascade within Venular Walls. *J. of innate immunity*, 336-347, 2013.

O'Neill A. J., Doyle B. T., Molloy E., Watson C., Phelan D., Greenan M. C., Fitzpatrick J. M., Watson R. W. Gene expression profile of inflammatory neutrophils: alterations in the inhibitors of apoptosis proteins during spontaneous and delayed apoptosis. *Shock*, p. 512–518, 2004.

Orrenius S., Nicotera P., Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol Sci.*, p. 3-19, 2011.

Ortega-Gómez, A., Perretti, M., Soehnlein, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, 661-674, 2013.

Perretti M., Croxtall J. D., Wheller S. K., Goulding N. K., Hannon R., Flower R. J. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nature medicine*. P. 1259-1262, 1996.

Petri B., Sanz M. J. Neutrophil chemotaxis. *Cell and Tissue Research*. 1-12, 2018.

Phillipson M1, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*. 2569-2575, 2006.

Pinho V., Souza D. G., Barsante M. M., Hamer F.P., De Freitas M. S., Rossi A. G., Teixeira M. M. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J Leukoc Bio.*, p. 800-810, 2005.

Pinho, V., de Castro Russo, R., Amaral, F. A., de Sousa, L. P., Barsante, M. M., de Souza, D. G., Alves-Filho J. C., Cara D. C., Hayflick J. S., Rommel C., Ruckle T., Rossi A. G., Teixeira M. M. Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. *J Immunol.*, 7891–7898, 2007.

Poon I. K. H., Lucas C. D., Rossi A. G., Ravichandran K. S. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.*, p. 166, 180, 2014.

Queiroz-Junior, C. M., Madeira, M. F., Coelho, F. M., Costa, V. V., Bessoni, R. L., Sousa, L. F., Garlet, G. P. *et al*, Experimental arthritis triggers peri-odontal disease in mice: involvement of TNF-alpha and the oral Micro-biota. *J. Immunol*. 187: 3821–3830, 2011.

Rabinovich G. A., Ariel A., Hershkovich R., Hirabayashi J., Kasai K. I., Lider O. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology.*, p. 100–106, 1999.

Rauch A., Hennig D., Schäfer C., Wirth M., Marx C., Heinzl T., Schneider G., Krämer O. H. Survivin and YM155: how faithful is the liaison? *Biochim Biophys Acta.*, p. 202-220, 2014.

Reis A. C. Alessandri A. L., Athayde R. M., Perez D. A., Vago J. P., Ávila T. V., Ferreira T. P. T., Arantes A. C. S., de Sá Coutinho D., Rachid M. A., Sousa L.P., Martins M. A., Menezes G. B., Rossi A.G., Teixeira M. M., Pinho V. Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. *Cell Death Dis.*, p. 1-10, 2015.

Rhys H.I., Dell'Accio F., Pitzalis C., Moore A., Norling L. V., Perretti M. Neutrophil Microvesicles from Healthy Control and Rheumatoid Arthritis Patients Prevent the Inflammatory Activation of Macrophages. *EBioMedicine*. p. 60-69, 2018.

Ruiz-Miyazawa K. W., Pinho-Ribeiro F. A., Zarpelon A. C., Staurengo-

Sabroe I., Jones E. C., Usher L. R., Whyte M. K., Dower S. K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol.* ; p. 4701–4710, 2002.

Sachs, D., Coelho, F.M., Costa, V. V., Lopes, F., Pinho, V., Amaral, F.A., Silva, T. A. *et al.*, Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *Br. J. Pharmacol.* 162: 72–83, 2011.

Sapra, P., Wang, M., Bandaru, R., Zhao, H., Greenberger, L. M., Horak, I. D. Down-modulation of survivin expression and inhibition of tumor growth in vivo by ezn-3042, a locked nucleic acid *antisense* oligonucleotide. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 29:97–112, 2010.

Scannell M., Flanagan M. B., deStefani A., Wynne K.J., Cagney G., Godson C., Maderna P. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol.*, p. 4595–4605, 2007.

Segal A. W., the phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol.*, p.4595–4605, 2007. Geisow M., Garcia R., Harper, A., Miller R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 290, p.406–409, 1981.

Serhan C.N., Gotlinger K., Hong S., Lu Y., Siegelman J., Baer T., , A Yang R., Colgan S. P., Petasis N. A. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes, *J. Immunol.*, p. 1848–1859, 2006.

Sharma S., Kaufmann T., Biswas S. Impact of inhibitor of apoptosis proteins on immune modulation and inflammation. *Immunol Cell Biol.*, p. 236-243, 2017.

Solito E., de Coupade C., Canaider S., Goulding N. J., Perretti M. Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase- activation. *Br J Pharmacol*, p.217–228, 2001.

Song Z., Yao X., Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem*. p. 23130–23140, 2003.

Souleimanian N., Deleavey G. F., Soifer H., Wang S., Tiemann K., Damha M. J., Stein C. A. Antisense 2'-Deoxy, 2'-Fluoroarabino Nucleic Acids (2'F-ANAs) Oligonucleotides: In Vitro Gymnotic Silencers of Gene Expression Whose Potency Is Enhanced by Fatty Acids. *Mol Ther Nucleic Acids*, p. 1-9, 2012.

Sousa L. P., Alessandri A. L., Pinho V., Teixeira M. M. Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. p. 625-31, 2013.

Sousa L. P., Carmo A. F., Rezende B. M., Lopes F., Silva D. M., Alessandri A. L., Bonjardim CA, Rossi AG, Teixeira MM, Pinho V. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol.*, p. 396–405, 2009.

Sousa L. P., Lopes F., Silva D. M., Tavares L. P., Vieira A. T., Rezende B. M., Carmo A. F., Russo R. C., Garcia C. C., Bonjardim C. A., Alessandri A. L., Rossi A. G., Pinho V., and Teixeira M. M. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kB-independent manner. *J. Leukoc. Biol.*, p. 895–904, 2010.

Stein C.A. , Hansen J.B. , Lai J. , Wu S. , Voskresenskiy A. , Høg A. , Worm J., Hedtjörn M. , Souleimanian N., Miller P., Soifer H. S., Castanotto D., Benimetskaya L., Ørum H.,

Koch T. Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res.* p. 1-8, 2010.

Sugimoto M. A, Ribeiro A. L. C. , Costa B. R. C. , Vago J.P., Lima K.M., Carneiro F.S., Ortiz M. M. O., Lima G. L. N., Carmo A. F., Rocha R. M., Perez D. A., Reis A. C., Pinho V., Miles L. A., Garcia C. C., Teixeira M. M., Sousa L. P. Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. *Blood*, p. 2896–2907, 2017.

Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., Teixeira, M. M. Resolution of inflammation: what Controls its Onset? *Frontiers in immunology*. 7:1-18, 2016.

Suresh, G., Priyakumar, U. D. Structures, Dynamics, and Stabilities of Fully Modified Locked Nucleic Acid (β -D-LNA and α -L-LNA) Duplexes in Comparison to Pure DNA and RNA Duplexes. *J. Phys. Chem. B*, 5556–5564, 2013.

Sydlik, U., Peuschel, H., Paunel-Gorgulu, A., Keymel, S., Kramer, U., Weissenberg, A., Kroker, M., Seghrouchni, S., Heiss, C., Windolf, J. Recovery of neutrophil apoptosis by ectoine: a new strategy against lung inflammation. *EurRespir J*. 41: 433-442, 2013.

Tang C., Lu Y. H., Xie J. H., Wang F., Zou J. N., Yang J. S., et al. Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis. *Anticancer Drugs*, p. 249–258, 2009.

Taylor A.W., Streilein J.W., Cousins S.W. Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-stimulated T cell production of gamma-interferon. *Neuroimmunomodulation*, p. 188–194, 1994.

Teng Tie-Shan, Ji Ai-ling, Ji Xin-Ying, Li Yan-Zhang. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered Action to Being Conquered. *Journal of Immunology*. 1-14, 2017.

Vago J. P., Tavares L. P., Garcia C. C., Lima K. M., Perucci L. O., Vieira É. L., Nogueira C. R., Soriani F. M., Martins J. O., Silva P. M., Gomes K. B., Pinho V., Bruscoli S., Riccardi C., Beaulieu E., Riccardi C., Beaulieu E., Morand E. F., Teixeira M. M., Sousa L. P. The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution. *J. Immunol.*, p. 4940–4950, 2015.

Vago J. P., Tavares L. P., Sugimoto M. A., Lima G. L., Galvão I., de Caux T.R., Lima K. M., Ribeiro A. L., Carneiro F. S., Nunes F. F., Pinho V., Perretti M., Teixeira M. M., Sousa L. P. Proresolving Actions of Synthetic and Natural Protease Inhibitors Are Mediated by Annexin A1. *J Immunol.*, p. 1922-32, 2016.

Vago, J. P., Nogueira C. R., Tavares L. P., Soriani F. M., Lopes F., Russo R. C., Pinho V., Teixeira M. M., Sousa L. P. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J. Leukoc. Biol.*, p. 249–258, 2012.

Vasudevan D., Ryoo H. D. Regulation of Cell Death by IAPs and Their Antagonists. *Curr Top Dev Biol.*, p. 185-208, 2015.

Vieira A.T., Galvão I., Macia L.M., Sernaglia É.M., Vinolo M.A., Garcia C.C. , Tavares L.P., Amaral F.A., Sousa L.P., Martins F.S., Mackay C.R., Teixeira M. M. Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. *J Leukoc Biol.*101: 275-284, 2017.

Webb D. R. Animal models of human disease: inflammation. *Biochem Pharmacol.* P. 121-130, 2014.

Werth K., Förster R., Active Shaping Of Chemokine Gradients By Atypical Chemokine Receptors: A 4D Live-Cell Imaging Migration Assay. *Methods in Enzymology.* p. 293-308, 2016.

Werz O., Gerstmeier J., Garscha U., Novel leukotriene biosynthesis inhibitors (2012-2016) as anti-inflammatory agents. *Expert Opin Ther Pat.*, p. 607-620, 2017.

Withers P. C. Comparative Animal Physiology. *Saunders College Pub*, 942 p, 1992.

Xiao M. e Li W. Recent Advances on Small-Molecule Survivin Inhibitors. *Curr Med Chem.*, p. 1136–1146, 2015.

Zhao P., Meng Q., Liu L. Z., You Y. P., Liu N., Jiang, B.H. Regulation of survivin by PI3K/Akt/p70S6K1 pathway. *Biochem Biophys Res C*