

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Laís Cunha Grossi Ferreira

**EFEITO DE GILZ (*GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER*) NA
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

Belo Horizonte - MG

2022

Laís Cunha Grossi Ferreira

**EFEITO DE GILZ (*GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER*) NA
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

Belo Horizonte - MG

2022

F383e Ferreira, Laís Cunha Grossi.
Efeito de GILZ (*Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper*) na migração de células mononucleares [recurso eletrônico] / Laís Cunha Grossi Ferreira. – 2022.

1 recurso eletrônico (74 f. : il.) : pdf

Orientadora: Lirlândia Pires de Sousa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Inflamação – Teses. 2. Células – Teses. 3. Migração – Teses. 4. *Escherichia coli* – Teses. 5. Glicocorticoide – Teses. I. Sousa, Lirlândia Pires de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.0473

Elaborado por Leandro da Conceição Borges – CRB-6/3448

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

FOLHA DE APROVAÇÃO

“EFEITO DE GILZ (GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER) NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES”

LAIS CUNHA GROSSI FERREIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dra. Juliana Priscila Vago da Silva
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 02 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Lirlândia Pires de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 02/12/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Priscila Vago da Silva, Usuário Externo**, em 02/12/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 02/12/2022, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).





https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1913012** e o código CRC **37A41700**.

Referência: Processo nº 23072.268690/2022-78

SEI nº 1913012

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

Folha de Aprovação FARMACIA-SECCPGCFA 1913012 SEI 23072.268690/2022-78 / pg.1

Folha de Aprovação FARMACIA-SECCPGCFA 1913012 SEI 23072.268690/2022-78 / pg.2

DEDICATÓRIAS

Dedico esse trabalho a minha amada mãe Ana Eliza (*in memoriam*), com quem pude desfrutar do puro e genuíno amor. Te carrego para sempre em mim.

Ao meu pai, Silvio, por ser calma e paciência;

Á meu irmão Lucas por compartilhar todos os momentos da minha vida e por ser um grande exemplo para mim;

Á meu marido, Rodrigo, pelo amor, entendimento e companheirismo;

Aos meus avós, Cornélio/Terezinha e Aires/Alice, por todo incentivo ao estudo e educação.

AGRADECIMENTOS

À Deus e meus pais, que me deram o dom da vida e me possibilitaram sonhar e realizar.

À minha orientadora, professora Lirlândia Sousa, por acreditar em mim e proporcionar todo suporte, orientação e paciência durante esse período. Profunda admiração e respeito pela pessoa e profissional que é.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao Laboratório de Sinalização da Inflamação e Neoplasia (Faculdade de Farmácia).

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e apoio nos inúmeros experimentos, principalmente Bella, meu braço direito na execução desse projeto, com quem pude contar nos momentos difíceis e alegres, que pude aprender cientificamente e acima de tudo criar uma amizade para vida toda. Obrigada por tudo!

À Dr^a. Juliana Vago pela paciência, pela disponibilidade em ajudar e por ser uma pessoa que pude ter como referência durante o período do mestrado. Obrigada por ter aceito o convite para contribuir ainda mais com esse trabalho.

Ao meu marido, Rodrigo, pelas diversas trocas científicas e por compartilhar a vida e a profissão de uma forma simples e admirável.

Ao professor Dr. Flávio Amaral pela disponibilidade ao aceitar fazer parte da banca examinadora e ao Laboratório de Imunofarmacologia (Instituto de Ciências Biológicas) pelo apoio para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Mauro Martins Teixeira pela colaboração no desenvolvimento deste projeto e pelo suporte científico e financeiro.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

À todos os professores que contribuíram para minha formação, técnicos e colegas de trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

Os macrófagos são células essenciais para a resolução da inflamação, contribuindo para a eliminação de patógenos e de células apoptóticas (eferocitose), conduzindo assim ao processo de homeostase tecidual. Estudos sobre a proteína GILZ (*Glucocorticoid-induced Leucine Zipper*) em modelos pré-clínicos de inflamação têm demonstrado suas ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas. Aqui, investigamos o papel de GILZ em um evento chave de resolução da inflamação - o recrutamento não flogístico de células mononucleares. Para tal, camundongos WT receberam uma injeção intrapleural de PBS, TAT ou TAT-GILZ (uma proteína de fusão a GILZ permeável às células) e foram sacrificados em diferentes momentos. Exsudatos pleurais foram utilizados para contagem morfológica de leucócitos, fenotipagem celular, dosagens de citocinas/quimocinas e avaliação da expressão de proteínas. Em um modelo auto-resolutivo de peritonite, camundongos WT e GILZ^{-/-} foram inoculados com 1x10⁶ UFC de *Escherichia coli* e sacrificados em diferentes momentos pós-infecção. Exsudatos peritoneais foram coletados para contagem morfológica de leucócitos, fenotipagem celular, determinação da apoptose e eferocitose, mensuração de citocinas/quimocinas e determinação da carga bacteriana. Ensaio *in vitro* de quimiotaxia e fagocitose também foram realizados. Os dados obtidos demonstram que TAT-GILZ induziu a quimiotaxia de macrófagos RAW 264.7 e a injeção de TAT-GILZ na pleura de camundongos induziu um influxo de leucócitos dependente do tempo, composto principalmente por células mononucleares dotadas de fenótipo regulatório, apresentando maior expressão de CD206 e YM1 (marcadores do fenótipo M2). A migração dessas células foi acompanhada por aumento dos níveis de CCL2, IL-10 e TGF- β . Durante a fase de resolução da peritonite por *E. coli*, cuja celularidade é composta principalmente por células mononucleares, animais GILZ^{-/-} apresentaram menor recrutamento dessas células associado com menores níveis de CCL2. Além disso, apresentaram menor número de macrófagos do fenótipo M2 e menor frequência do marcador CD206, seguido de maior carga bacteriana e menor porcentagem de neutrófilos apoptóticos e eferocitose. Ensaio de fagocitose bacteriana *in vitro* utilizando macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) ou do peritônio de animais GILZ^{-/-} mostraram menor

capacidade fagocítica quando comparadas às células de animais WT. De forma interessante, o pré-tratamento com TAT-GILZ aumentou a função fagocítica dos macrófagos de animais WT e resgatou essa função efetora em macrófagos de GILZ^{-/-}. Em resumo, TAT-GILZ induziu recrutamento de células mononucleares dependentes de CCL2 e polarização de macrófagos para um fenótipo resolutivo/regulatório, caracterizado pelo aumento de P-STAT3, IL-10, TGF- β , CD206 e YM1. A deficiência em GILZ resultou em menor recrutamento de células mononucleares e deficiência na polarização de macrófagos para um fenótipo regulatório durante a peritonite. Além disso, o tratamento *in vitro* com TAT-GILZ promoveu aumento da fagocitose bacteriana.

Palavras chaves: GILZ; células mononucleares; migração; resolução da inflamação; *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Macrophages are critical cells for the resolution of inflammation, contributing to the elimination of pathogens and apoptotic cells, paving the way to the tissue homeostasis. Studies on GILZ (*Glucocorticoid Induced Leucine Zipper*) in different pre-clinical models of inflammation have shown its anti-inflammatory and pro-resolving actions. Herein, we investigated the role of GILZ in a key event of inflammation resolution named non-phlogistic recruitment of mononuclear cells. To assess GILZ-induced migration, WT mice received an intrapleural injection of PBS, TAT or TAT-GILZ (a cell permeable GILZ-fusion protein) and were euthanized at different time points. Pleural exudates were harvested for morphological leukocyte counts, cell phenotyping, cytokine/chemokine levels measurement and evaluation of protein expression. In a self-resolving model of peritonitis, WT and GILZ^{-/-} mice were inoculated with 1x10⁶ CFU of *E. coli* and euthanized at different times post-infection. Peritoneal exudates were harvested for morphological leukocyte count, cell phenotyping, determination of apoptosis and efferocytosis, cytokines/chemokines levels measurement and determination of bacterial load. *In vitro* chemotaxis assays and bacterial phagocytosis were performed. Our data demonstrated that TAT-GILZ induced chemotaxis of RAW264.7 macrophages and that injection of TAT-GILZ into the pleura of WT mice induced a time-dependent influx of leukocytes, which was mainly composed by mononuclear cells with a regulatory phenotype displaying high expression of the M2 markers CD206 and YM1. The migration of these cells was accompanied by increased levels of CCL2, IL-10 and TGF-β. During the resolution phase of peritonitis, which the cellularity is composed mainly by mononuclear cells, GILZ^{-/-} mice showed lower recruitment of these cells associated with lower levels of CCL2. In addition, GILZ^{-/-} mice showed a lower number of M2 macrophages and a lower frequency of the CD206 marker, followed by a higher bacterial load and lower percentage of apoptotic neutrophils and efferocytosis. Bacterial phagocytosis assays using bone marrow-derived macrophages (BMDMs), showed that pre-treatment with TAT-GILZ increased this effector function of macrophages. Conversely, phagocytic capacity from peritoneal cells and BMDMs from GILZ^{-/-} mice was lower than those of cells from WT mice, and this function was rescued by treatment with TAT-GILZ. In summary, GILZ induced CCL2-

dependent mononuclear cells recruitment and macrophage polarization for a regulatory phenotype characterized by increased P-STAT3 and up-regulation of IL-10, TGF- β , CD206 and YM1. Conversely, GILZ^{-/-} mice showed numbers of mononuclear cells into the peritoneal cavity and defective macrophage polarization towards a regulatory phenotype, culminating with lower effector function of these cells. Furthermore, in the context of *E. coli* infection *in vitro*, TAT-GILZ promoted increased phagocytosis.

Keywords: GILZ; mononuclear cells; migration; resolution of inflammation; *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eventos desencadeados que levam a resolução ideal do processo inflamatório agudo.

Figura 2 – Atuação dos macrófagos na regulação da resposta inflamatória.

Figura 3 – Vias de interações de GILZ durante um processo inflamatório.

Figura 4 – TAT-GILZ induz migração de macrófagos *in vitro*.

Figura 5 – Efeito do TAT-GILZ na migração de neutrófilos humanos.

Figura 6 – TAT-GIZ induz recrutamento de monócitos/macrófagos para cavidade pleural de animais de forma tempo-dependente e associado ao aumento dos níveis da quimiocina CCL2.

Figura 7 – Efeitos causados pela proteína de fusão TAT *in vivo*.

Figura 8 – Efeito do receptor CCR2 na migração de macrófagos induzida por TAT-GILZ.

Figura 9 – Perfil dos macrófagos recrutados para cavidade pleural dos animais e citocinas produzidas após estímulo de TAT-GILZ.

Figura 10 – Efeito da deficiência gênica de GILZ no recrutamento de células mononucleares no modelo auto-resolutivo de peritonite induzido por *Escherichia coli*.

Figura 11 – Efeito da deficiência gênica de GILZ no fenótipo de macrófagos no modelo auto-resolutivo de peritonite induzido por *E. coli*.

Figura 12 – Efeito de GILZ na fagocitose de *E. coli*.

Figura 13 – Desenho esquemático do papel de GILZ no recrutamento de monócitos/macrófagos, reprogramação macrofágica e *clearance* de *E. coli* no peritônio.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

AnxA1: anexina A1

AP-1: activator protein 1 (proteína ativadora-1)

ATCC 25922: *American Type Culture Collection 25922* – cepa da bactéria Enterobacteriaceae - *Escherichia coli* - Estirpe da FDA Seattle 1946 [DSM 1103, NCIB 12210].

ATP: adenosina trifosfato

BSA: *bovine serum albumin* – albumina de soro bovino

CCL- (): Chemokine (CC motif) Ligand () – quimiocina ligante () com motivo CC

CEUA: Comitê de Ética para Uso de Animais

CFU: *Colony forming unit* – unidade formadora de colônia

CO₂: Dióxido de carbono

CXCL- (): Chemokine (CXC motif) Ligand () – quimiocina ligante () com motivo CXC

DAMP: *damage-associated molecular patterns* – padrões moleculares associados ao dano

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ERK1/2: *Extracellular signal-regulated kinase* – cinase regulada por sinal extracelular

GC: glicocorticoide

GR: *glucocorticoid receptor* – receptor de glicocorticóide

GILZ: *glucocorticoid-induced leucine zipper* – proteína induzida por glicocorticoide que possui zipper de leucina

GRE: *glucocorticoid responsive elements* – elementos responsivos aos glicocorticoides

IL- (): interleucina- ()

i.pl.: intrapleurar

i.p.: intraperitoneal

LPS: Lipopolissacarídeo

M: molar

mg: miligrama

mg/kg: miligramas por quilograma

mg/mL: miligramas por mililitro

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MOI: multiplicidade de infecção

NaCl: Cloreto de sódio

NFκB: *Nuclear Factor kappa B* (Fator nuclear kappa B)

nm: nanômetro

OD: *Optical Density* – densidade óptica

OPD: *o-phenylenediamine dihydrochloride*

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns) padrões moleculares associados a patógenos)

PBS: *Phosphate-Buffered Saline* (tampão salina fosfato)

pH: potencial hidrogeniônico

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrão

ROS: Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)

RPM: rotações por minuto

SEM: *Standard error of mean* - erro padrão da média

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

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

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Processo inflamatório.....	16
1.2 Resolução da inflamação e mediadores pró-resolutivos	18
1.3 Macrófagos e a resposta inflamatória.....	21
1.4 GILZ: efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos.....	24
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVO.....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Obtenção do peptídeo TAT-GILZ.....	30
4.3 <i>Escherichia coli</i>	31
4.4 Cultura celular	31
4.4.1 <i>Cultivo de células RAW</i>	31
4.4.2 <i>Isolamento e cultivo de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)</i>	31
4.4.3 <i>Isolamento de neutrófilos do sangue periférico humano</i>	32
4.4.4 <i>Obtenção de macrófagos peritoneais para ensaio de fagocitose</i>	33
4.5 Ensaio <i>in vitro</i>	33
4.5.1 <i>Experimentos de migração celular com células mononucleares e neutrófilos</i>	33
4.5.2 <i>Fagocitose bacteriana</i>	34
4.5.3 <i>Teste de sensibilidade</i>	34
4.5.4 <i>Experimentos cinéticos in vitro utilizando BMDMs</i>	35
4.6 Ensaio <i>in vivo</i> e expressão de proteínas	35
4.6.1 <i>Recrutamento induzido por TAT-GILZ</i>	35
4.6.2 <i>Modelo inflamatório murino auto-resolutivo</i>	35
4.6.3 <i>Contagem total e diferencial das células</i>	36
4.6.3.1 <i>Contagem de neutrófilos apoptóticos e avaliação da eferocitose</i> ..	36
4.6.4 <i>Perfil fenotípico das células recrutadas para a cavidade pleural e peritoneal dos animais</i>	36
4.6.5 <i>Dosagens de citocinas e quimiocinas por ELISA</i>	37

4.6.6 <i>Western Blot para análise de expressão de proteínas</i>	38
4.6.6.1 Obtenção dos extratos protéicos	38
4.6.6.2 Quantificação de proteínas totais nas amostras obtidas	38
4.6.6.3 Fracionamento eletroforético e transferência	38
4.6.6.4 Imunoblot e revelação	39
4.6.7 <i>Análises estatísticas</i>	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 GILZ induz quimiotaxia de células mononucleares <i>in vitro</i>	40
5.2 GILZ e quimiotaxia de neutrófilos.....	41
5.3 TAT-GILZ induz migração de células mononucleares <i>in vivo</i> , dependente do tempo e acompanhado do aumento de CCL2.....	42
5.4 TAT-GILZ induz o recrutamento de macrófagos via CCR2	44
5.5 Macrófagos recrutados por TAT-GILZ apresentam fenótipos resolutivos/regulatórios	45
5.6 GILZ é importante para o recrutamento de células mononucleares, depuração bacteriana e eferocitose.....	48
5.7 A ausência de GILZ promove a diminuição da expressão de marcadores pró-resolutivos em macrófagos.....	50
5.8 A ausência de GILZ afeta a capacidade fagocitária de macrófagos e esta função é restaurada pelo pré-tratamento com TAT-GILZ.....	51
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO I.....	75
ANEXO II.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Processo inflamatório

A inflamação é definida como um processo imunológico desencadeado frente a um estímulo indutor, seja por danos químicos ou físicos, de natureza autoimune ou em resposta a agentes infecciosos. Esse processo tem como principal finalidade a proteção, adaptação e retorno da homeostase tecidual (Nathan 2002). No primeiro século a.C., o médico Cornelius Celsus descreveu os sinais cardinais macroscópicos da inflamação, o rubor, tumor, calor e a dor. Posteriormente, Rudolf Virchow relatou a perda da função associada à disfunção dos órgãos envolvidos no processo inflamatório como o quinto sinal cardinal da inflamação (Medzhitov 2010).

Sabe-se que a resposta inflamatória é um processo complexo, altamente dinâmico e organizado. Tal processo é guiado por inúmeros componentes, como moléculas sinalizadoras e grupos celulares distintos, desde a fase inicial até a fase de pós resolução, descrita recentemente como estado de “homeostase adaptada” (Feehan and Gilroy 2019). Uma resposta inflamatória efetiva se caracteriza pela eliminação do agente indutor, interrupção do recrutamento de células polimorfonucleares (PMN), como os neutrófilos, basófilos e eosinófilos com posterior indução de apoptose das mesmas e remoção dos corpos apoptóticos pelos macrófagos. Os macrófagos assumem um papel crucial na resolução, alterando seu fenótipo para perfis anti-inflamatórios e pró-resolutivos, os quais produzem mais mediadores pró-resolutivos e fazem a limpeza final do tecido promovendo a homeostase tecidual. Esses eventos são essenciais para equilibrar e controlar a inflamação, visando a restauração da arquitetura tecidual e função orgânica tecidual (Alessandri, Sousa et al. 2013). Uma resposta inflamatória falha ou disfuncional está relacionada a patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas ou autoimunes como artrite reumatóide, asma e esclerose múltipla, e também contribui para a gravidade e mortalidade de doenças infecciosas (Sugimoto, Vago et al. 2019).

Do ponto de vista molecular, o início da resposta inflamatória ocorre como consequência da ativação de receptores de reconhecimento de padrão (PRR) por agentes indutores, como os padrões moleculares associados a patógenos (MAMPs) e os padrões moleculares associado ao dano (DAMPs). Os PRRs estão presentes nas células imunes residentes teciduais e circulantes, e sua

ativação leva ao desencadeamento de vias intracelulares específicas (Prince, Whyte et al. 2011). A via de sinalização pró-inflamatória é classicamente centrada na ativação do fator de transcrição do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que, por sua vez, desencadeia a expressão de genes pró-inflamatórios e anti-apoptóticos (Hagiwara, Iwasaka et al. 2009). Como resultado, ocorrem eventos vasculares e celulares, alterações na microcirculação, liberação de mediadores inflamatórios solúveis (quimiocinas, citocinas, radicais livres, aminas vasoativas e eicosanoides) e acúmulo de leucócitos no local acometido (Nathan 2002, Norling and Serhan 2010).

A inflamação é caracterizada, em sua fase inicial, principalmente pela liberação de mediadores pró-inflamatórios e quimiotáticos (CXCL8, IL-6, TNF- α , CXCL1 e CXCL2) por células residentes no tecido lesado (células dendríticas, macrófagos e mastócitos). Tais mediadores promovem a ativação e migração de leucócitos circulantes para o sítio inflamatório, induzindo mudanças nas propriedades dessas células e das células endoteliais (Nourshargh and Marelli-Berg 2005, Simon and Green 2005). Uma das principais alterações é o aumento da expressão de moléculas de adesão (selectinas e integrinas) por ambos tipos celulares (leucócitos circulantes e células endoteliais), permitindo a transmigração e influxo de células PMNs e exsudação de líquido e proteínas do sangue para o tecido em direção ao estímulo quimiotático (Simon and Green 2005, Petri, Phillipson et al. 2008, Yuan, Shen et al. 2012). Os neutrófilos representam o grupo mais abundante de leucócitos encontrados na circulação sanguínea humana e embora suas ações mais estudadas e conhecidas sejam centradas na indução da resposta pró-inflamatória (Petri, Phillipson et al. 2008), trabalhos recentes tem apontando que estas células podem também contribuir para o processo resolutivo (Bird 2020, Mattos, Lopes et al. 2020). Além disso, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o tecido lesado, seguida de monócitos (Petri, Phillipson et al. 2008). Ao atingir o sítio inflamatório, essas células atuam no combate ao agente indutor e na eliminação de microrganismos e os danos teciduais causados pela reação inicial, por diferentes mecanismos. Tais mecanismos podem compreender a fagocitose, netose, a liberação de proteases e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hickey and Kubes 2009, Wright, Gibson et al. 2016).

A inflamação aguda é caracterizada pelo desenvolvimento de uma resposta imune que se inicia rapidamente, com ação curta, tendo como principal característica o recrutamento e acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos, no tecido afetado ou foco inflamatório. Porém, a chegada e função excessiva/descontrolada dessas células podem ser mais deletério do que a própria infecção ou lesão e tem sido considerado um mau marcador da homeostase do tecido (Tavares, Peh et al. 2020). Portanto, se houver acúmulo excessivo de neutrófilos e o dano tecidual for extenso e duradouro, o processo inflamatório pode culminar em um estágio crônico, onde há depósito de colágeno e cicatrização, usualmente levando a perda da função tecidual (Gilroy, Lawrence et al. 2004).

A atenuação da resposta inflamatória ocorre quando há a remoção do agente incitante, inibição da sinalização pró-inflamatória seguido da eliminação de seus mediadores. Esses eventos diminuem o recrutamento de células PMNs para os locais inflamatórios e estabelece a base para os passos seguintes da resposta inflamatória. Vale ressaltar que os eventos que ocorrem no início da inflamação governam um programa de resolução ativo e coordenado, em outras palavras “o início programa o fim” (Serhan and Savill 2005). Dessa maneira, o processo inicial da inflamação é regido por vários eventos com o propósito de controlar e equilibrar a resposta inflamatória, caminhando idealmente à fase de resolução da inflamação.

1.2 Resolução da inflamação e mediadores pró-resolutivos

A fase de resolução da inflamação consiste na eliminação completa das células inflamatórias recrutadas na fase inicial, com o objetivo de reverter o acúmulo de granulócitos no local inflamatório e reprogramar o tecido nos níveis celular e molecular (Serhan and Savill 2005, Serhan, Chiang et al. 2008). Por esse motivo, é necessário que, após o início da resposta inflamatória, se estabeleça um programa resolutivo ativo e coordenado, a fim de criar um ambiente favorável para que a inflamação termine adequadamente (Sugimoto, Sousa et al. 2016).

Alguns eventos caracterizam a fase da resolução da inflamação, como o tamponamento de quimiocinas e citocinas de perfil pró-inflamatório, a modulação das vias de sinalização associadas à sobrevivência de neutrófilos, subsequente

indução de apoptose de granulócitos seguido de *clearance* pelos macrófagos. Além desses eventos, é descrito a reprogramação de macrófagos para um fenótipo regulador, com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos. Relata-se ainda, o recrutamento não flogístico de monócitos/macrófagos, que consiste na migração destas células para o local acometido de maneira não flogística, ou seja, independente da produção de mediadores pró-inflamatórios (Sousa, Alessandri et al. 2013, Sugimoto, Sousa et al. 2016, Sugimoto, Vago et al. 2019). Esses eventos estão demonstrados na figura 1.

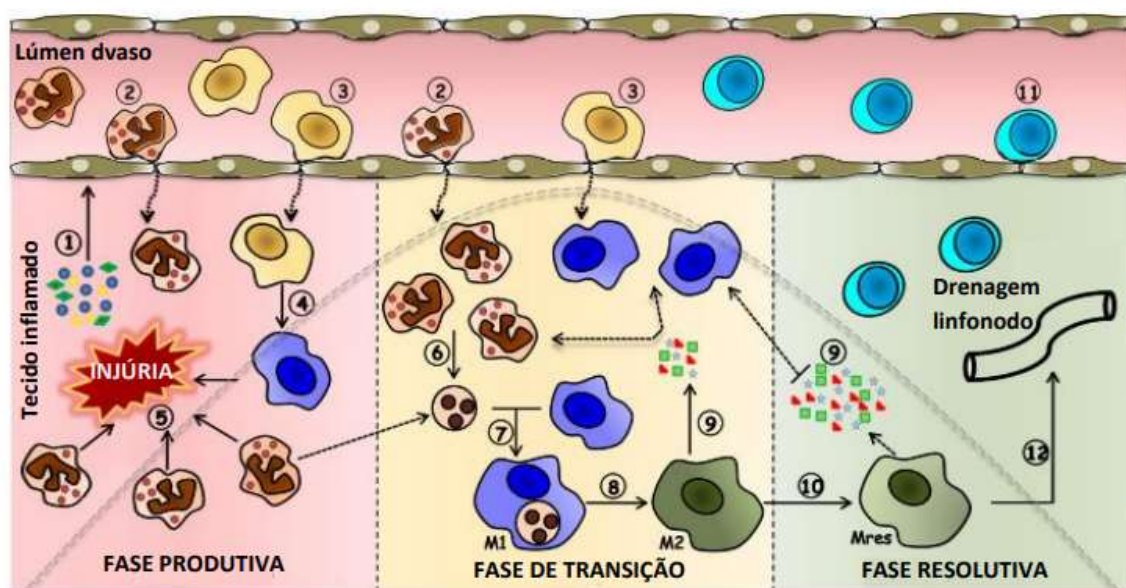


Figura 1 – Eventos desencadeados que levam a resolução ideal do processo inflamatório agudo. A lesão tecidual estéril ou infecciosa leva ao reconhecimento de padrões moleculares (DAMPs e/ou MAMPs) pelas células residentes, as quais produzem rapidamente vários mediadores pró-inflamatórios. Na fase produtiva da inflamação, esses mediadores levam à ativação endotelial e recrutamento de leucócitos para o local inflamado. Leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são geralmente as primeiras células a serem recrutadas, seguidas de monócitos. Essas células exercem, portanto, suas funções efetoras contra o agente responsável pela lesão. Em uma fase de transição, ocorre intensa apoptose de PMNs, seguida por eferocitose por macrófagos, que alteram, conseqüentemente, seu perfil inflamatório (M1) para anti-inflamatório (M2). Esses macrófagos liberam mediadores anti-inflamatórios e resolutivos, essenciais para o início do processo de resolução. Nesse processo, macrófagos do tipo M2 têm seu perfil alterado para macrófagos do tipo resolutivo (Mres), que produzem moléculas antioxidantes e antifibróticas, conduzindo finalmente ao retorno da homeostase tecidual com o mínimo de lesão. Adaptado de Alessandri *et al.*, 2013.

A migração não flogística de monócitos representa um passo importante para a resolução da inflamação, pois desempenham um papel anti-inflamatório/pró-resolutivo e são necessários para o *clearance* de células

apoptóticas (Hochreiter-Hufford and Ravichandran 2013). Um defeito na remoção de células apoptóticas pode levar a necrose secundária dessas células, com liberação de conteúdo extracelular para o microambiente tecidual podendo promover ativação de eventos inflamatórios prejudiciais ao tecido. Esse defeito está associado a muitas doenças inflamatórias autoimunes e crônicas (Nathan and Ding 2010, Poon, Lucas et al. 2014). Além disso, ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o processo de eferocitose modula a resposta inflamatória, pois promove a reprogramação de macrófagos de um fenótipo pró-inflamatório para um fenótipo pró-resolutivo (Ariel and Serhan 2012, Sousa, Alessandri et al. 2013).

A resolução da inflamação é um processo contínuo e orquestrado por um grande painel de moléculas. Essas moléculas são conhecidas como mediadores pró-resolutivos e possuem a função de limitar o dano tecidual excessivo, culminando na restauração bem-sucedida da homeostase tecidual (Serhan 2007, Sousa, Alessandri et al. 2013).

As moléculas “imunoresolutivas” ou mediadores pró-resolutivos, são de natureza diversa, incluindo os mediadores lipídicos especializados como lipoxinas, resolvinas, protectinas, maresinas, os mediadores proteicos como anexina A1 (AnxA1), Galectina e GILZ e neuromoduladores, entre outros (Sugimoto, Vago et al. 2019). Evidências indicam que a administração de moléculas pró-resolutivas contribui para a resolução, aumentando as defesas do organismo e acelerando o retorno da homeostase após a infecção (Tavares, Melo et al. 2022).

Algumas moléculas, como por exemplo, a plasmina (Carmo, Costa et al. 2014, Sugimoto, Ribeiro et al. 2017), a anexina A1 (Vago, Nogueira et al. 2012, Sugimoto, Vago et al. 2016, Vago, Tavares et al. 2016, Galvão, Vago et al. 2017, Perucci, Sugimoto et al. 2017, Machado, Tavares et al. 2020), o AMP cíclico (Negreiros-Lima et al., 2020) e o peptídeo Ang-(1-7) (Barroso, Magalhaes et al. 2017, Magalhaes, Barroso et al. 2018, Zaidan, Tavares et al. 2022), foram recentemente investigadas nesse contexto pelo nosso e por outros grupos de pesquisa. Quanto à migração de monócitos/macrófagos, foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que a ang-(1-7) (Zaidan, Tavares et al. 2022), a anexina A1 (McArthur, Gobbetti et al. 2015), o AMP cíclico (Negreiros-Lima, Lima et al. 2020) e a plasmina (Carmo, Costa et al. 2014) possuem *per si* a capacidade de induzir a

migração dessas células na ausência de estímulo inflamatório. Foi observado também, que as células recrutadas para a cavidade pleural após injeção destas moléculas, eram quase inteiramente células mononucleares sem qualquer modificação significativa no número de neutrófilos, sugerindo recrutamento específico desse tipo celular. Ainda, os macrófagos recrutados apresentaram fenótipos regulatórios/pró-resolutivos como M2 e Mres (Sugimoto, Ribeiro et al. 2017, Negreiros-Lima, Lima et al. 2020, Zaidan, Tavares et al. 2022).

1.3 Macrófagos e a resposta inflamatória

Os macrófagos são células altamente heterogêneas e se diferenciam a partir dos monócitos, células sanguíneas oriundas de células tronco-hematopoiéticas. Estão localizadas estrategicamente em todos os tecidos do corpo, participando do patrulhamento da homeostase e/ou gerando respostas adicionais a sinais inflamatórios (Abdulkhaleq, Assi et al. 2018).

Os monócitos são reconhecidos como uma das principais células efetoras da resposta imunológica devido sua plasticidade, ou seja, alta habilidade em se diferenciar em diferentes populações de células com fenótipos efetores distintos sob determinados estímulos. Essas células possuem um papel relevante na imunidade inata e adaptativa, pois interagem com um grande número de moléculas e células imunológicas (Geissmann, Manz et al. 2010).

O sistema fagocitário mononuclear representa um subgrupo de leucócitos originalmente descrito como uma população de células mieloides derivadas da medula óssea que circulam pela corrente sanguínea, como monócitos, e povoam os tecidos como macrófagos no estado de equilíbrio e durante o processo inflamatório (Murray and Wynn 2011). Essas células possuem em sua superfície receptores celulares que as permitem interagir e responder a mudanças em seu microambiente, o que facilita suas funções como os primeiros respondedores do sistema imunológico a nível tecidual. Além do reconhecimento de estímulos inflamatórios, os macrófagos também expressam receptores e outras moléculas de superfície para permitir a fagocitose de corpos estranhos, bactérias ou células apoptóticas (Rasheed and Rayner 2021).

Após infecção ou lesão tecidual, iniciam-se interações complexas entre o agente indutor e o hospedeiro, onde as células imunes reconhecem padrões associados aos patógenos (PAMPS) ou associados ao dano (DAMPS). O

reconhecimento desses sensores desencadeia rapidamente uma série de respostas imunes antimicrobianas através da indução de várias citocinas inflamatórias, quimiocinas e interferons tipo I, nas quais aumentam o recrutamento de monócitos e neutrófilos que conduzem as respostas inflamatórias iniciais (Kumar, Kawai et al. 2011).

Os primeiros macrófagos a chegarem no local acometido são estimulados por IFN- γ e ativam o arsenal microbiano adquirindo um perfil pró-inflamatório e são denominados M1. Esse perfil celular confere ao macrófago alta capacidade fagocítica e estão envolvidos com a liberação de mediadores inflamatórios, como: citocinas (IL-1 e TNF- α), quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Figura 2).

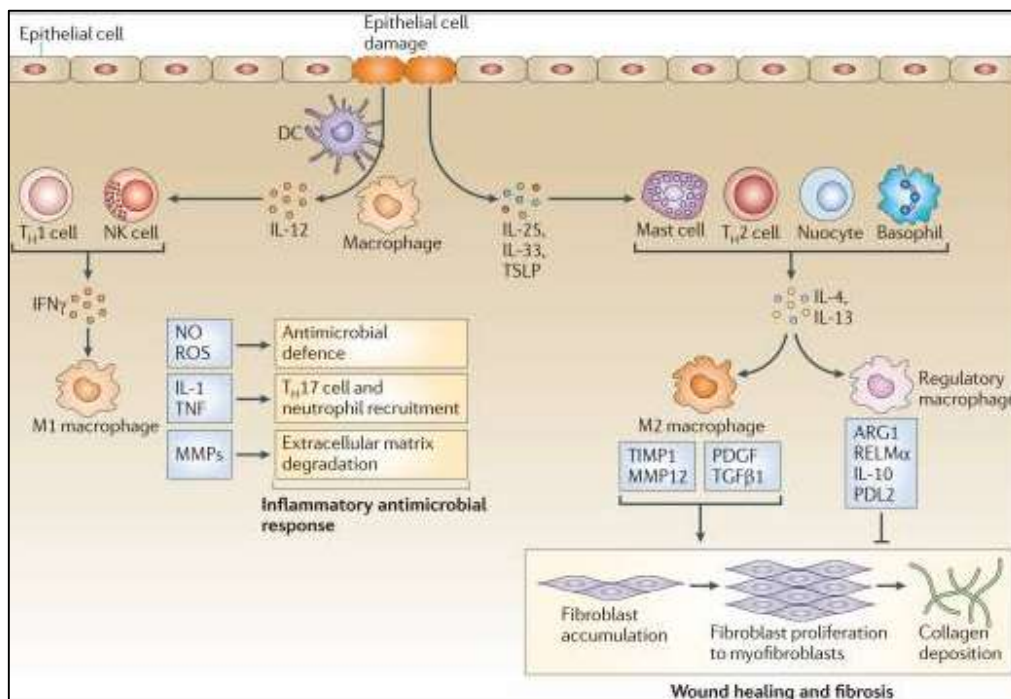


Figura 2 – Atuação dos macrófagos na regulação da resposta inflamatória. Quando os tecidos são danificados, mediadores inflamatórios são liberados, ocorre dilatação dos vasos sanguíneos e o aumento da permeabilidade, permitindo o recrutamento eficiente de monócitos inflamatórios para o local da lesão tecidual, onde se diferenciam em macrófagos e são ativados por várias citocinas, como o interferon- γ (IFN γ), que são liberados de células inflamatórias vizinhas, incluindo neutrófilos, células natural killer (NK), macrófagos teciduais residentes e células T. Durante esta fase inicial de migração de leucócitos, macrófagos inflamatórios frequentemente apresentam um fenótipo semelhante ao M1, produzindo óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF). Se a injúria ao tecido persistir, as células M1 ativadas podem exacerbar ainda mais a resposta inflamatória. As células epiteliais danificadas também liberam IL-25, IL-33 e linfopoietina estromal tímica (TSLP), que induzem a secreção de IL-4 e IL-13 por uma variedade de células imunes inatas e adaptativas. Quando o estímulo inflamatório ou patógeno é eliminado, a ativação das

células M1 diminui, suprimindo a proliferação de células T e a síntese de colágeno por miofibroblastos ativados. Os macrófagos M2 também promovem a resolução da cicatrização de feridas antagonizando as respostas inflamatórias M1. Adaptado de Murray *et al.*, 2011.

Além disso, na fase produtiva da inflamação, vias de sinalização correspondente a morte celular são desativadas. Porém, com o passar do tempo, células que foram recrutadas no início da resposta inflamatória, começam a sofrer apoptose e precisam necessariamente serem removidas pelo processo de eferocitose para evitar o dano tecidual (Hochreiter-Hufford and Ravichandran 2013).

Após a fagocitose de células apoptóticas, e sob estímulos do microambiente inflamatório, ocorre uma polarização dos macrófagos para o fenótipo M2, aumentam a sua capacidade eferocítica e produzem moléculas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β . Essa transição de um ambiente dominado por IFN- γ e TNF- α para um rico em citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento (por exemplo, IGF-1) pode apoiar a transição funcional de macrófagos (Oishi and Manabe 2018). Além disso, as moléculas e os mediadores produzidos pelos macrófagos M2 induzem o recrutamento de monócitos de maneira não flogística, tornando mais eficiente o processo de eferocitose (Godson, Mitchell *et al.* 2000, Carmo, Costa *et al.* 2014, Negreiros-Lima, Lima *et al.* 2020). Esses tipos de macrófagos, possuem em sua superfície celular, marcadores que nos permite diferencia-los em fenótipos reguladores. Por exemplo, a expressão de CD206 por macrófagos, confere a essas células um perfil do tipo M2 e estão envolvidos com o reparo tecidual e tem um papel importante no retorno da homeostase (Kawakubo, Miyagi *et al.* 2022).

Uma vez desempenhado seu papel de remoção de células apoptóticas, *in vivo*, os macrófagos M2 sofrem novamente uma polarização para o fenótipo Mres (macrófago resolutivo). Esse processo também causa redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e indução das citocinas pró-resolutivas e promotoras de reparo tecidual TGF- β e IL-10 (Fadok, Bratton *et al.* 1998, Byrne and Reen 2002). Além disso, a eferocitose induz alterações típicas de M2 nos macrófagos, pois promove ativação de vias de sinalização pró-resolutivas desencadeadas por moléculas derivadas da degradação fagolisossomal (Gerlach, Ampomah *et al.* 2021).

O Mres é dito como um macrófago que apresenta baixa capacidade eferocítica e está envolvido com aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, pró resolutivos e anti-fibróticos, participando ativamente da resolução inflamatória, sendo posteriormente drenado pelos vasos linfáticos (Ariel and Serhan 2012).

Recentemente foi demonstrado que GILZ, uma proteína induzida por glicocorticoide contendo zíper de leucina, atua na polarização de macrófagos para fenótipos resolutivos e depuração de células apoptóticas, eventos chave na resolução da inflamação (Vago, Galvão et al. 2020). Porém, mais estudos são necessários para um melhor entendimento das propriedades pró-resolutivas dessa proteína.

1.4 GILZ: efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos

Em 1997, durante um estudo com o objetivo de caracterizar genes induzidos pelo medicamento dexametasona, um glicocorticoide sintético, foi identificada pela primeira vez, a proteína GILZ, que foi reconhecida como um indutor dos efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides (GC) (D'Adamio, Zollo et al. 1997).

GCs exógenos representam uma classe de anti-inflamatórios amplamente utilizada na prática clínica para tratamento de muitas doenças reumáticas, desordens de natureza autoimune, inflamatória ou alérgica (Vandevyver, Dejager et al. 2013) e representa a primeira exploração bem-sucedida de uma molécula endógena (cortisol) que tem sido utilizada de forma eficaz durante décadas (Kadmiel and Cidlowski 2013). A maioria das ações dos GCs são mediadas através da ligação a seus receptores específicos, denominados de receptores de mineralocorticoides (MR) ou receptores de glicocorticoides (GR) (Medzhitov 2010). Quando os GCs se ligam ao receptor específico (GR), promove a dissociação do heterocomplexo com conseqüente translocação do homodímero GC-GR para o núcleo (Oakley and Cidlowski 2011). No núcleo, se ligam a sítios específicos no DNA, denominados elementos responsivos aos glicocorticoides (GRES). Essa ligação induz, principalmente, a síntese de proteínas anti-inflamatórias, como GILZ, Anexina A1, fosfatase MPK-1 e proteínas que atuam no metabolismo sistêmico ou na regulação de genes pró-inflamatórios (Clark 2007, Vandevyver, Dejager et al. 2013).

Estudos posteriores, a fim de elucidar os efeitos induzidos pela proteína GILZ no mecanismo inflamatório, foi demonstrado capacidade de GILZ em interagir e inibir os principais fatores pró-inflamatórios, como NF- κ B e AP-1, bem como outras moléculas de sinalização, incluindo Raf-1, Ras, MAPK/ERK 1/2 (Ricci, Ronchetti et al. 2019). O primeiro relato do mecanismo de ação de GILZ interagindo e inibindo a atividade do fator de transcrição NF- κ B foi descrito e caracterizado em células T (Ayroldi, Migliorati et al. 2001). Atualmente, é bem esclarecido que GILZ se liga e inibe a subunidade p65/NF- κ B, mediada por domínios ricos em prolina presentes na porção terminal da proteína (Bruscoli, Febo et al. 2021) – Figura 3.

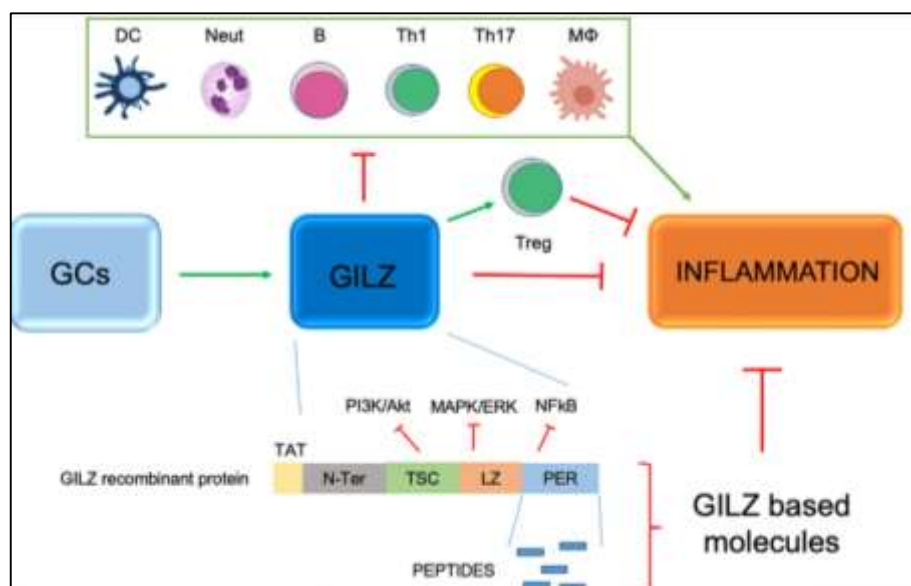


Figura 3 – Vias de interações de GILZ durante um processo inflamatório. Representação esquemática da eficácia de GILZ em processos inflamatórios e atividade anti-inflamatória de moléculas, como peptídeos derivados da região rica em ácido glutâmico e prolina (PER) da proteína GILZ e proteína de *full length* TAT-GILZ. As setas verdes indicam regulação positiva; linhas vermelhas indicam regulação negativa. DC, células dendríticas; Neut, neutrófilos; B, células B; TH1, células T auxiliares Tipo-1; Th17, células T auxiliares Tipo-17; MΦ, monócitos/macrófagos; Células T reguladoras. Adaptado de Bruscoli *et al.*, 2021.

Desde então, GILZ foi descrito em diferentes modelos de inflamação, como mediador de vários efeitos anti-inflamatórios dos GCs, demonstrando ter um papel anti-inflamatório e pró-resolutivo (Beaulieu and Morand 2011, Hoppstädter, Kessler et al. 2015, Vago, Tavares et al. 2015, Ballegeer, Vandewalle et al. 2019, Hoppstädter, Diesel et al. 2019, Ellouze, Vigouroux et al.

2020, Vago, Galvão et al. 2020). Em modelo letal de sepse polimicrobiana induzida por ligadura e punção cecal (CLP), camundongos transgênicos superexpressando GILZ apresentaram melhores taxas de sobrevivência associada a redução nas contagens bacterianas no sangue, aumento na fagocitose e da expressão de GILZ nas células do exsudato peritoneal (Ballegeer, Vandewalle et al. 2019). Outro estudo mostrou que camundongos superexpressando GILZ em monócitos/macrófagos apresentam maior capacidade fagocítica, menores níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias e maiores taxas de sobrevivência quando comparado aos camundongos selvagens (Ellouze, Vigouroux et al. 2020).

Em um estudo recente, foi relatado que TAT-GILZ (GILZ associado a proteína de fusão TAT) reduziu a inflamação neutrofílica e preveniu o dano pulmonar associado à pneumonia pneumocócica. Houve também aumento da eferocitose por macrófagos e maior eliminação bacteriana em camundongos tratados com TAT-GILZ. Esses achados foram associados ao controle da inflamação e da carga bacteriana pulmonar, levando à diminuição da letalidade dos animais com pneumonia pneumocócica (Souza, Carvalho et al. 2022).

Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que a expressão de GILZ é aumentada durante a fase de resolução da pleurisia induzida por LPS, especialmente em macrófagos com fenótipos resolutivos. Foi mostrado também que a administração exógena de TAT-GILZ aumentou os índices de resolução (Vago, Tavares et al. 2015). Tal resultado foi obtido por indução de apoptose de neutrófilos, diminuição de neutrófilos viáveis através da modulação da ativação de vias de sobrevivência (ERK 1/2, NF- κ B e Mcl-1), redução do nível de infiltração de PMN e diminuição do intervalo de resolução; eventos considerados marcadores de uma resposta resolutiva eficiente (Vago, Tavares et al. 2015). Nesse mesmo estudo, demonstrou-se que a injeção do peptídeo mimético da AnxA1 denominado Ac2-26 em camundongos inflamados por LPS aumentou a expressão de GILZ em macrófagos, sugerindo que AnxA1 está envolvida em um mecanismo que leva à regulação positiva da expressão de GILZ *in vivo* (Vago, Tavares et al. 2015).

Em estudo mais recente, foi demonstrado que a expressão de GILZ está elevada em macrófagos do tipo M2, e o tratamento *in vitro* de macrófagos M1 com TAT-GILZ diminui a produção das citocinas IL-6 e TNF- α produzidas por

estes macrófagos pró-inflamatórios. Além disso, TAT-GILZ aumentou a taxa de eferocitose de neutrófilos apoptóticos *in vitro* e *in vivo*, evidenciando o papel de GILZ como um modulador do fenótipo de macrófagos com efeitos diretos na resolução da resposta inflamatória (Vago, Galvão et al. 2020).

Assim, esses estudos mostraram que, além de induzir apoptose de neutrófilos, GILZ também induz reprogramação de macrófagos para fenótipos resolutivos e aumenta a eferocitose (fagocitose de células apoptóticas).

2 JUSTIFICATIVA

Dentro do contexto de estudos de processos inflamatórios existe um grande interesse em elucidar os mecanismos envolvidos no recrutamento e eliminação de células imunes no sítio inflamatório. Promover um recrutamento eficiente dessas células com o mínimo de dano ao tecido acometido é um dos grandes desafios no controle do processo inflamatório, visto que os mediadores provenientes dos leucócitos podem levar a lesão tecidual e disfunção do órgão. Por outro lado, o recrutamento não flogístico de monócitos/macrófagos promove a eliminação dos neutrófilos apoptóticos pelo processo de eferocitose, prevenindo assim a necrose secundária destas células e promovendo a resolução do processo inflamatório.

O efeito de GILZ em diferentes modelos de inflamação tem sido explorado utilizando várias abordagens que demonstram, de forma geral, que GILZ pode atuar como um importante mediador anti-inflamatório e pró-resolutivo. Dentre seus efeitos, destaca-se a inibição de vias pró-inflamatórias e seus mediadores (IL-6 e TNF- α) (Ayroldi and Riccardi 2009), indução de apoptose de neutrófilos (Vago, Tavares et al. 2015), reprogramação de macrófagos para fenótipos resolutivos com consequente aumento da eferocitose de neutrófilos apoptóticos (Vago, Galvão et al. 2020). Além disso, alguns estudos recentes, incluindo do nosso grupo de pesquisa, mostram que GILZ também tem um papel importante na promoção do *clearance* bacteriano durante a sepse polimicrobiana experimental (Ellouze, Vigouroux et al. 2020) e a pneumonia pneumocócica (Souza, Carvalho et al. 2022), com consequente diminuição do dano tecidual e aumento da sobrevivência dos animais.

No entanto, ainda não é conhecido o potencial de GILZ em induzir o recrutamento de células importantes para a resolução, como os monócitos/macrófagos, o papel das quimiocinas e os mecanismos intrínsecos a este processo. O estudo dos diversos fatores envolvidos no acúmulo leucocitário no sítio inflamatório é fundamental para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que possam interferir nessas vias, controlando a inflamação.

Dado o exposto, nesse projeto nos propusemos estudar o papel de GILZ na migração não flogística de monócitos/macrófagos e em um modelo inflamatório infeccioso auto-resolutivo.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Estudar o papel de GILZ na migração de células mononucleares, no contexto da administração da proteína ou da deficiência gênica, avaliando a capacidade de GILZ em modular a migração de leucócitos e os mecanismos subjacentes a esse processo.

3.2 Objetivos Específicos

1- Avaliar a capacidade da proteína TAT-GILZ (proteína de fusão associada a GILZ) em induzir quimiotaxia *in vitro*, de células mononucleares murinas (macrófagos RAW 264.7) e de neutrófilos humanos;

2- Avaliar a cinética de migração/recrutamento de leucócitos, após injeção de TAT-GILZ na cavidade pleural de camundongos;

3- Investigar o envolvimento do eixo CCL2/CCR2 na migração de monócitos/macrófagos, induzida por TAT-GILZ;

4- Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas produzidas durante a migração celular induzida por TAT-GILZ;

5- Analisar o perfil dos macrófagos recrutados com TAT-GILZ, por meio de marcadores fenótipos de macrófagos regulatórios.

6- Analisar o papel do GILZ endógeno na migração de células mononucleares, utilizando um modelo auto-resolutivo da inflamação aguda induzido por *Escherichia coli*, em animais WT (selvagens) comparando-os aos animais deficientes em GILZ (GILZ^{-/-}).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os experimentos com animais foram realizados em camundongos machos C57BL/6 (8-10 semanas de idade) fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram utilizados também camundongos machos deficientes para GILZ (GILZ^{-/-}) criados no Biotério do laboratório de Imunofarmacologia do ICB – UFMG e os respectivos pareamentos C57BL/6 WT da mesma ninhada, de 8 a 10 semanas de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas microisoladores, em estantes com filtros de entrada e saída de ar, em condições controladas de temperatura e luminosidade, tendo livre acesso (*ad libitum*) à água e ração.

Camundongos C57BL/6 machos deficientes em GILZ (GILZ^{-/-}) foram gerados conforme descrito (Ngo, Beaulieu et al. 2013). O gene GILZ está ligado ao cromossomo X e os camundongos GILZ^{-/-} machos são inférteis (Bruscoli, Velardi et al. 2012, Romero, Vuandaba et al. 2012). Portanto, fêmeas heterozigóticas são cruzadas com machos WT. Foram utilizadas ninhadas de diferentes criações, pareadas por idade e peso. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), protocolo 183/2017 (anexo I).

4.2 Obtenção do peptídeo TAT-GILZ

O peptídeo TAT e a proteína de fusão TAT-GILZ foram construídos pela inserção de cDNA de GILZ no vetor TAT-C para produzir uma proteína de fusão *in-frame*, gerados conforme descrito anteriormente (Cannarile, Cuzzocrea et al. 2009, Vago, Tavares et al. 2015, Baban, Marchetti et al. 2018). Cada lote de TAT e TAT-GILZ foi preparado em condições livres de LPS (Delfino, Agostini et al. 2004, Baban, Marchetti et al. 2018, Vago, Galvão et al. 2020), ressuspensas em DMSO 100% e diluídas posteriormente em salina. Para todos os experimentos foram utilizadas doses equimolares de TAT e TAT-GILZ, considerando que o peso molecular de TAT é metade do TAT-GILZ.

A proteína de fusão TAT associado a GILZ foi obtida em parceria com o Prof. Carlo Riccardi, do Departamento de Medicina da Universidade de Perugia – Itália, nosso colaborador neste projeto.

4.3 *Escherichia coli*

Para a realização dos experimentos de infecção foi utilizada a cepa de *E.coli* (ATCC 25922), que foi cultivada em meio Miller Hinton (MH) ou caldo de cultura LB (Luria Bertani) ou ágar MacConkey. Nos dias anteriores à infecção, as bactérias foram semeadas em placas de MH e incubadas a 37°C em estufa incubadora, por 18h. Posteriormente, algumas colônias de bactérias foram transferidas para 15 mL de caldo de cultura LB e incubadas a 37°C por 12 horas. Após esse período, a cultura foi submetida a análise de densidade optica (D.O.) e centrifugada para retirada do meio. Foram também realizadas duas lavagens com 10 mL de salina 0,9% estéril apirogênica, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de salina estéril. A suspensão foi usada para ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo*. Em todos os experimentos o inóculo foi confirmado por meio da semeadura de diferentes diluições da suspensão de bactérias em ágar MacConkey e contagem das colônias após 18h de incubação a 37°C.

4.4 Cultura celular

4.4.1 Cultivo de células RAW

Células RAW 264.7 foram descongeladas e centrifugadas a 1.300 RPM por 5 minutos, ressuspenso e cultivadas em meio DMEM (Cultilab), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SBF) e antibióticos (100U/mL de penicilina G e 100µg/mL de gentamicina). A cultura celular foi mantida em garrafas pequenas (25 cm² – Kasvi), após o descongelamento e observada a confluência, repicadas para garrafas médias (75 cm² – Kasvi). As células foram mantidas sob 37°C e 5% de CO₂, em estufa incubadora (ThermoScientific). A viabilidade celular foi determinada usando o ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

4.4.2 Isolamento e cultivo de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Foram retirados os fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 machos WT (tipo selvagem) e deficientes para o gene GILZ (GILZ^{-/-}). Posteriormente, os ossos ficaram imersos em RPMI em tubo tipo Falcon, sendo as epífises cortadas e a agulha inserida no interior dos ossos para retirada da medula óssea. Foi usado o meio RPMI não suplementado utilizando seringa de 5mL. As células

obtidas do lavado foram colocadas em tubo Falcon já contendo meio RPMI, e posteriormente centrifugadas a 1300 RPM, 5 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 30% de LCCM (sobrenadante de células L929) e antibióticos (penicilina e estreptomicina), dissociando levemente os grumos com a pipeta sorológica. A suspensão celular foi colocada em garrafas de cultura médias juntamente com 20 mL de meio RPMI completo. No terceiro dia de diferenciação retirou-se 1/3 do volume total contido na garrafa (aproximadamente 7 mL) e adicionou-se mais 7 mL de meio completo às garrafas. No sétimo dia os sobrenadantes da cultura foram descartados e os macrófagos aderentes foram desprendidos da superfície da garrafa através de raspador de células, sendo manipuladas cuidadosamente em uma única direção. O conteúdo de cada garrafa foi centrifugado em tubo Falcon de 50 mL, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas e plaqueadas na concentração de 1×10^6 células por poço (placa de 24 poços) para ensaio de cinética de tratamento com TAT-GILZ e 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços para ensaio de fagocitose.

4.4.3 Isolamento de neutrófilos do sangue periférico humano

Uma amostra de sangue venoso foi coletada de doadores voluntários saudáveis (Comitê de Ética em Pesquisa – COEP da UFMG, protocolo número 0319.0.203.000-11) em tubos com sistema Vacuette® contendo citrato (3,2%). Os neutrófilos foram isolados utilizando o protocolo de gradientes de Histopaque (Histopaque 1077 e 1119 - Sigma-Aldrich) (Vago, Tavares et al. 2016). Após a adição de 3 mL de Histopaque 1119 seguida de 3 mL de Histopaque 1077 em tubos Falcon™ de 15 mL, foram adicionados 6 mL de suspensão preparada com 3 mL de meio RPMI 1640 e 3 mL de sangue citratado. Os tubos foram então centrifugados a 1.300 RPM durante 30 minutos, com desaceleração nula. As camadas correspondentes a cada perfil celular foram recolhidas separadamente, com auxílio de pipeta Pasteur estéril (BD Bioscience), sendo novamente lavados em meio RPMI 1640 e centrifugados a 1.500 RPM por 15 minutos. O grau de pureza dos neutrófilos obtidos foi avaliado em preparação de citospin e foi acima de 95%.

4.4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais para ensaio de fagocitose

Camundongos *naive* C57BL/6 machos, WT e GILZ^{-/-}, foram submetidos ao protocolo de eutanásia mediante utilização de dióxido de carbono (CO₂), previamente aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA, número do protocolo: 183/2017). Posteriormente foram submetidos a lavagem peritoneal para recolhimento dos macrófagos presentes na cavidade. O processo foi realizado de forma asséptica e em capela de fluxo laminar. As células foram coletadas utilizando pipeta de Pasteur com 3 mL de PBS 1x estéril e, adicionadas gentilmente em tubos Falcon de 15 mL. Posteriormente foram centrifugadas a 1.300 RPM por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de PBS/BSA 3%. Uma alíquota de 20 µL da suspensão foi diluída 1:10 em solução de Turk para contagem celular. 2,6 x 10⁵ células foram plaqueadas por poço em placas de 96 poços e após aderência foram submetidas ao ensaio de fagocitose.

4.5 Ensaio *in vitro*

4.5.1 Experimentos de migração celular com células mononucleares e neutrófilos

A migração celular induzida por TAT-GILZ foi analisada por quimiotaxia utilizando-se placas Transwell de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY) com membranas de policarbonato com tamanho de poro de 5,0 µm. Células RAW 264.7 foram suspensas em DMEM sem SFB e adicionadas ao compartimento superior de cada poço na concentração de 5x10⁵ células. TAT-GILZ (0,2 e 2 µg/mL) ou CCL2 (quimiocina quimioatrativa para células mononucleares - 100ng) ou meio, foram adicionados aos compartimentos inferiores e as células foram permitidas migrar durante 4 horas a 37°C. As membranas de policarbonato foram fixadas e coradas com hematoxilina (Accustain; Sigma). Para avaliar os efeitos da proteína TAT-GILZ sobre a migração de neutrófilos, alíquotas da suspensão celular contendo 5x10⁵ células foram adicionadas ao compartimento superior da placa transwell sobre uma membrana com diâmetro médio de poro de 3,0 µm. Nos compartimentos inferiores da placa foram adicionados somente meio de cultura (RPMI) ou meio contendo o agente quimiotático fMLP (10⁻⁹M). O sistema foi incubado por 3 horas (atmosfera úmida, 37 °C, 5% CO₂) e, após este período, a membrana foi

removida para posterior fixação e coloração com Panótico. As contagens de células foram realizadas com uma ampliação de 100X. Os experimentos foram realizadas em triplicatas experimentais.

4.5.2 Fagocitose bacteriana

A fagocitose foi avaliada conforme descrito anteriormente (Machado, Tavares et al. 2020, Zaidan, Tavares et al. 2022). Para os ensaios de fagocitose, $2,6 \times 10^5$ macrófagos peritoneais ou BMDMs $2,0 \times 10^5$ isolados de camundongos WT ou GILZ^{-/-}, foram plaqueados e incubados com *E.coli* (MOI 1:10) durante 1h a 4°C para adesão das bactérias, seguido de 2h a 37°C e 5% de CO₂ para permitir a fagocitose. As bactérias não internalizadas foram lavadas e a células incubadas com gentamicina (30 µg/mL em meio por 30 minutos). Após 30 minutos, as células foram lavadas com PBS 1x e lisadas. O extrato obtido foi plaqueado em placas de ágar MacConkey para se avaliar as bactérias fagocitadas. As bactérias internalizadas viáveis foram contadas após incubação durante 15h a 37°C e 5% de CO₂. O pré-tratamento com TAT ou TAT-GILZ foi de 18 h antes dos experimentos e a concentração foi baseada em estudos prévios (Delfino, Agostini et al. 2004, Vago, Galvão et al. 2020).

4.5.3 Teste de sensibilidade

Com uma alça bacteriológica de platina devidamente flambada e resfriada colônias recentes de *E. coli* foram suspensas em salina estéril (NaCl) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac-Farland (1×10^8 CFU/mL). Em seguida, um swab estéril foi embebido na suspensão bacteriana, sendo comprimido contra as paredes do tubo para tirar o excesso da suspensão, para então ser semeado de forma suave abrangendo toda a superfície da placa de cultura MH. Assim que a superfície do ágar secou, os discos com gentamicina ou impregnados com TAT ou TAT-GILZ foram colocados, com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. A presença/ausência de zona de inibição foi analisada após 18h de incubação a 37°C.

4.5.4 Experimentos cinéticos *in vitro* utilizando BMDMs

O experimento foi conduzido em células BMDMs de animais C57BL/6 machos WT e conforme descrito anteriormente (Zaidan, Tavares et al. 2022). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de 1×10^6 macrófagos por poço. Doses equimolares de TAT ou TAT-GILZ foram utilizadas para estímulo das células e foram deixadas sob estímulo durante 6, 12, 24 e 48 horas. Após os períodos estabelecidos, os sobrenadantes da cultura celular foi recolhido para dosagem de citocinas por Elisa e as células guardadas para avaliação da expressão de proteínas por Western Blot.

4.6 Ensaios *in vivo* e expressão de proteínas

4.6.1 Recrutamento induzido por TAT-GILZ

Os camundongos receberam uma injeção intrapleural (i.p.) de TAT-GILZ (100 ng/cavidade) ou TAT (50 ng/cavidade) ou PBS (mesmo volume). Células da cavidade pleural foram coletadas em diferentes tempos posteriormente a injeção, lavando-se a cavidade com 1 mL de PBS 1x estéril. Em alguns experimentos foi utilizado o inibidor de CCR2 (RS504393 – 2mg/kg) de acordo com (Carmo, Costa et al. 2014), sendo injetado 1 hora antes da injeção de TAT-GILZ. Os lavados pleurais foram coletados e centrifugados, sendo o sobrenadante utilizado para dosagens de quimiocinas/citocinas e as células para contagem morfológica, análise de expressão de proteínas por western blot e marcação extracelular para citometria de fluxo.

4.6.2 Modelo inflamatório murino auto-resolutivo

Camundongos WT e GILZ^{-/-} foram infectados por injeção de 1×10^6 UFC de *E. coli* na cavidade peritoneal. Após 6, 24, e 48 horas pós infecção os animais foram submetidos a eutanásia e as amostras coletadas. Foi realizado a lavagem da cavidade com 3mL de PBS 1x para recolhimento e contagem dos leucócitos recrutados. O lavado foi plaqueado em ágar MacConkey para contagem de UFC, o sobrenadante foi guardado para dosagens de citocinas/quimiocinas e as células foram destinadas a análise de expressão de marcadores por citometria de fluxo.

4.6.3 Contagem total e diferencial das células

Células da cavidade pleural e peritoneal foram centrifugadas a 1.200 RPM, por 5 minutos, a 4°C em centrífuga (ThermoScientific) e o sedimento celular ressuspenso em BSA 3% (p/v) diluído em PBS 1x. Uma alíquota das células foi diluída 10 vezes na solução de lise de hemácias (Solução de Turk - Imbralab) e, utilizando uma câmara de Neubauer, foi realizada a contagem total das células. A partir dessa contagem, uma parte das células foram citocentrifugadas a 450 RPM, por 5 minutos, com as células ressuspenso em 100µL de BSA, de forma que cada lâmina contivesse aproximadamente 100 mil células. Após a secagem das lâminas, essas foram coradas com o método de May-Grünwald-Giemsa utilizando o kit Panótico Rápido (LB Laborclin), para a realização da contagem diferencial de células no microscópio ótico (no aumento de 100 vezes). As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos e linfócitos) e neutrófilos, por meio de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células a cada contagem.

4.6.3.1 Contagem de neutrófilos apoptóticos e avaliação da eferocitose

A identificação e contagem de neutrófilos apoptóticos e macrófagos com corpos apoptóticos englobados foi realizada por microscopia óptica (objetiva 100x, 500 células/lâminas). Os resultados foram expressos como a média \pm SEM (erro padrão da média) da porcentagem de neutrófilos apoptóticos e macrófagos com células apoptóticas em seu interior (Souza, Carvalho et al. 2022).

4.6.4 Perfil fenotípico das células recrutadas para a cavidade pleural e peritoneal dos animais

Foi avaliado o fenótipo dos leucócitos recrutados para o peritônio após 48 horas de infecção por *E. coli* e para pleura após a injeção TAT-GILZ, sendo as aquisições realizadas utilizando o equipamento BD FACSCanto II (BD Bioscience). Para isso, células presentes na cavidade pleural e peritoneal foram coletadas, contadas, plaqueadas e marcadas com anticorpos fluorescentes contra F4/80 (PE, eBioscience), Ly6C (PeCy7, eBioscience), Ly6G (BV421), CD3 (Alexa 488), CD11b (BV-500), CD206 (APC, eBioscience). As análises foram realizadas através do Software FlowJo (Tree Star). Como estratégia para

caracterização dos leucócitos, foram considerados macrófagos - células F4/80 positivas, neutrófilos - Ly6G positivas, monócitos - Ly6C positivas - F4/80 negativas, e linfócitos - CD3 positivas.

Também foi utilizada a estratégia de gating para fenotipar a população de macrófagos, definida pela expressão de F4/80, CD11b, Ly6C e CD206, conforme descrito anteriormente (Vago, Sugimoto et al. 2019, Negreiros-Lima, Lima et al. 2020, Zaidan, Tavares et al. 2022).

4.6.5 Dosagens de citocinas e quimiocinas por ELISA

Os níveis de TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β , CXCL1 e CCL2 foram dosados nos sobrenadantes congelados, obtidos através das lavagens das cavidades pleural e peritoneal, pela utilização de kits de ELISA murino da R&D Systems (DuoSet). Na realização do ensaio, cada anticorpo de captura foi diluído em PBS 1X e pipetado na placa de 96 poços. Na sequência, a placa foi vedada e incubada a 4°C por 18-24 horas. Ao término da sensibilização, a placa foi lavada com solução de PBS-Tween 0,05% e bloqueada por 2 horas com solução a 1% de BSA em PBS 1X, sob agitação. Após essa etapa, procederam-se novas lavagens com PBS-Tween 0,05% e paralelamente foi preparada a diluição seriada da curva padrão. Foram pipetados o padrão, o branco (ambos em duplicata) e as amostras na placa que, na sequência, foi vedada e incubada, novamente a 4°C por 18-24 horas. Após outras lavagens, o anticorpo de detecção (diluído em 0,1% de BSA/PBS) foi adicionado à placa e esta foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente a placa foi lavada e a detecção foi realizada pela adição de estreptavidina conjugada a peroxidase (“HRP-StreptavidinPharmingem” - 1:4000) em cada poço com posterior incubação a temperatura ambiente, por 30 minutos, sob agitação. A revelação ocorreu após novas lavagens e adição do substrato OPD (o-phenylenediaminedihidrochloride) (Sigma). Após cerca de 20 minutos as reações foram interrompidas com H₂SO₄ (1M). A leitura foi realizada no espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) no comprimento de onda de 490nm. As colorações obtidas pelas reações foram diretamente proporcionais às concentrações das citocinas e quimiocinas nas amostras analisadas.

4.6.6 Western Blot para análise de expressão de proteínas

4.6.6.1 Obtenção dos extratos protéicos

Células obtidas do lavado pleural e peritoneal e de cultura celular de BMDM's foram lavadas com PBS 1X e lisadas pela adição de 200µL de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1 mM de NaVO₃, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 200 mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina) mantidas em banho de gelo por 15min. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10.000 RPM em microcentrífuga por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante aliqotado e guardado à -20°C até o momento de uso.

4.6.6.2 Quantificação de proteínas totais nas amostras obtidas

Para realizar a dosagem de proteínas totais foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-RadLaboratories) baseado no método de Bradford. O ensaio foi realizado em uma microplaca de 96 poços (NUNC™), e consistiu na adição de 2 µL de cada amostra a 200 µL do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente foi confeccionada uma curva padrão utilizando como solução padrão BSA 1mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 595 nm. As absorbâncias das amostras foram comparadas com as absorbâncias da curva padrão, e as concentrações calculadas e expressas em mg/mL (ou µg/µL).

4.6.6.3 Fracionamento eletroforético e transferência

Os extratos protéicos totais (60 µg) foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão LB 5X (10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250 M Tris/HCl pH 6,8) e a mistura mantida a 100°C por 5 minutos. Os extratos protéicos foram fracionados em gel de 8% ou 10% de poliacrilamida/SDS. Ao final da corrida, foram transferidos para membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECL™, GE Healthcare) e coradas com o reagente Ponceau para verificação do padrão de transferência. Posteriormente, a membrana foi lavada 5x com a solução de PBS/Tween 0,1% até que o corante fosse totalmente eliminado.

4.6.6.4 Imunoblot e revelação

As membranas foram bloqueadas com PBS/Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado por uma hora. Em seguida, elas foram lavadas com PBS/Tween e, incubadas com o anticorpo de interesse a 4°C overnight. Após novas lavagens com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente com o respectivo anticorpo secundário ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL™ (GE Healthcare) e expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL™, GE Healthcare). O filme foi revelado utilizando-se revelador e fixador (Kodak), conforme indicações do fabricante. Os anticorpos utilizados foram: anti-P-STAT3 1:1000 (CellSignaling Technology), anti-Ym1 (STEMCELL - Technologies) e anti-β-actina 1:10000 (SigmaAldrich) e anticorpos secundários conjugados com peroxidase - anti-rabbit 1:3000 e anti-mouse 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology). As análises densitométricas foram realizadas utilizando-se o programa Image J.

4.6.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (One-way ou two-way ANOVA), seguida do teste Newman-Keuls, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $P < 0.05$. Em alguns resultados foi utilizado o teste t. Os resultados são apresentados como média ± SEM (Erro Padrão da Média). As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o Software GraphPadPrism 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 GILZ induz quimiotaxia de células mononucleares *in vitro*

Tendo em vista a importância do recrutamento eficiente de células mononucleares durante uma resposta inflamatória (Carmo, Costa et al. 2014, Negreiros-Lima, Lima et al. 2020, Zaidan, Tavares et al. 2022), buscamos avaliar o efeito de TAT-GILZ na migração dessas células.

Inicialmente realizamos um ensaio exploratório de quimiotaxia *in vitro*, utilizando macrófagos RAW 246.7, observou-se que TAT-GILZ foi capaz de induzir a migração de macrófagos dependente da concentração quando comparada a células que não tiveram contato com nenhum agente quimiotático (CM- *control medium*) (Figura 4A). A menor concentração utilizada (0,2 µg/mL) promoveu quimiotaxia das células RAW de forma significativa, que foi aumentada ainda mais pela concentração crescente da proteína. As concentrações de TAT-GILZ utilizadas para o teste foi estipulada de acordo com estudos anteriores (Vago, Galvão et al. 2020). O controle TAT (proteína de fusão) não apresentou efeito quimiotático nessa linhagem celular (Figura 1A). A quimiocina CCL2 foi utilizada como padrão para a quimiotaxia de macrófagos - controle positivo do ensaio. Como resultado esperado, o agente quimiotático CCL2 induziu migração das células RAW 246.7.

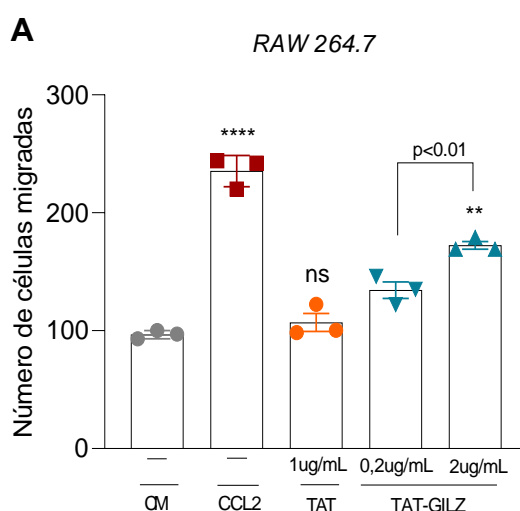


Figura 4 - TAT-GILZ induz migração de macrófagos *in vitro*. As células RAW 264.7 foram incubadas durante 4h e permitidas migrar através de membranas de policarbonato usando TAT ou TAT-GILZ em diferentes concentrações (0,2 e 2 ug/mL) (A). A quimiocina CCL2 (100 ng/mL) foi utilizada como controle positivo. ** p<0,01 **** p<0,001 quando comparado número de células que migraram a TAT-GILZ, TAT e aos grupos controles, por one-way ANOVA. Os resultados são

expressos e apresentados como média \pm SEM de, pelo menos, cinco campos aleatórios, representativo de 2 experimentos.

5.2 GILZ e quimiotaxia de neutrófilos

Os resultados dos experimentos realizados em macrófagos murinos (RAW 264.7) mostram que TAT-GILZ é capaz de induzir a quimiotaxia dessas células (Figura 4A). Sabendo que o término da resposta inflamatória requer uma série de eventos, como a inibição do recrutamento de células PMN, principalmente neutrófilos e, tendo em vista o papel relevante de GILZ nessas células (Vago, Tavares et al. 2015, Espinasse, Pépin et al. 2016) e nos eventos que antecedem a mudança do ambiente inflamatório para pró-resolutivo (Alessandri, Sousa et al. 2013, Vago, Tavares et al. 2020), nos perguntamos se TAT-GILZ influenciaria a quimiotaxia de neutrófilos.

Então, paralelamente, foram realizados ensaios de quimiotaxia com neutrófilos humanos. Podemos observar que TAT e TAT-GILZ não foram capazes de induzir migração dessas células, uma vez que o número de células que migraram foram semelhante ao número de células que migraram sem presença de estímulo quimiotático. Por outro lado, o agente quimiotático padrão utilizado aqui - fMLP (10^{-9} M) induziu a quimiotaxia de neutrófilos como esperado (Figura 5A).

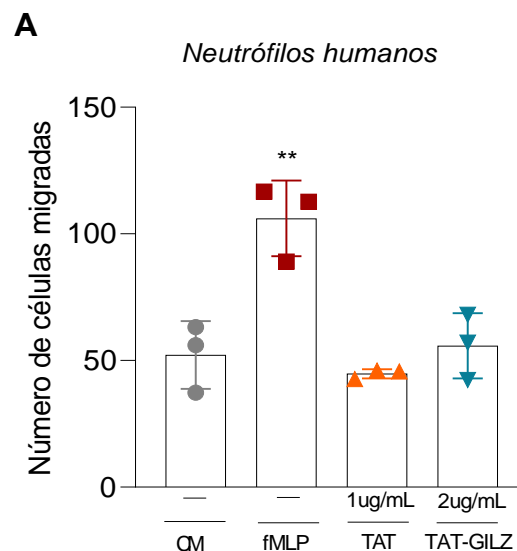


Figura 5 – Efeito do TAT-GILZ na migração de neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos foram isolados a partir de sangue periférico humano e em seguida permitidos migrar em membranas de policarbonato (tamanho do poro igual a $3\mu\text{m}$) durante 3 h, utilizando TAT, TAT-GILZ (2 ug/mL) ou o quimioatrativo padrão para neutrófilos, fMLP (10^{-9} M) (A). RPMI foi usado como controle negativo. Os resultados são expressos como o número de células que migraram e são apresentados como média \pm SEM de, pelo menos, cinco campos aleatórios. ** $p < 0,01$ ***

$p < 0,001$ quando comparado número de células que migraram a TAT-GILZ, TAT e aos grupos controles, por one-way ANOVA. Os resultados são expressos são apresentados como média \pm SEM de, pelo menos, cinco campos aleatórios.

Esses resultados *in vitro* mostram que TAT-GILZ *per se* possui ação apenas na indução da quimiotaxia de macrófagos em ausência de estímulos inflamatórios.

5.3 TAT-GILZ induz migração de células mononucleares *in vivo*, dependente do tempo e acompanhado do aumento de CCL2

A partir dos resultados obtidos *in vitro*, nos propusemos a avaliar a habilidade de TAT-GILZ em induzir migração de leucócitos *in vivo*. Então demos seguimento ao ensaio de cinética de migração, sendo um grupo de animais foi injetado na cavidade pleural com 100ng de TAT-GILZ e outro com 50ng de TAT e as células da cavidade pleural coletadas após diferentes intervalos de tempo.

A injeção de TAT-GILZ foi capaz de promover um influxo celular para cavidade pleural dos animais, com aumento significativo do número de células no tempo de 48 horas (Figura 6A). Por meio das contagens celulares e imunofenotipagem das células recrutadas, pode-se inferir que a migração induzida pela proteína TAT-GILZ foi praticamente exclusiva da população mononuclear (Figura 6B), não havendo, portanto, recrutamento da população de neutrófilos para a cavidade pleural nos tempos aqui analisados.

Também foram dosadas citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória e recrutamento celular. Pode-se observar que a sinalização induzida por TAT-GILZ foi capaz de elevar os níveis de CCL2, com pico de 4h, sem modificar os níveis de CXCL1 e das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α (Figura 6C).

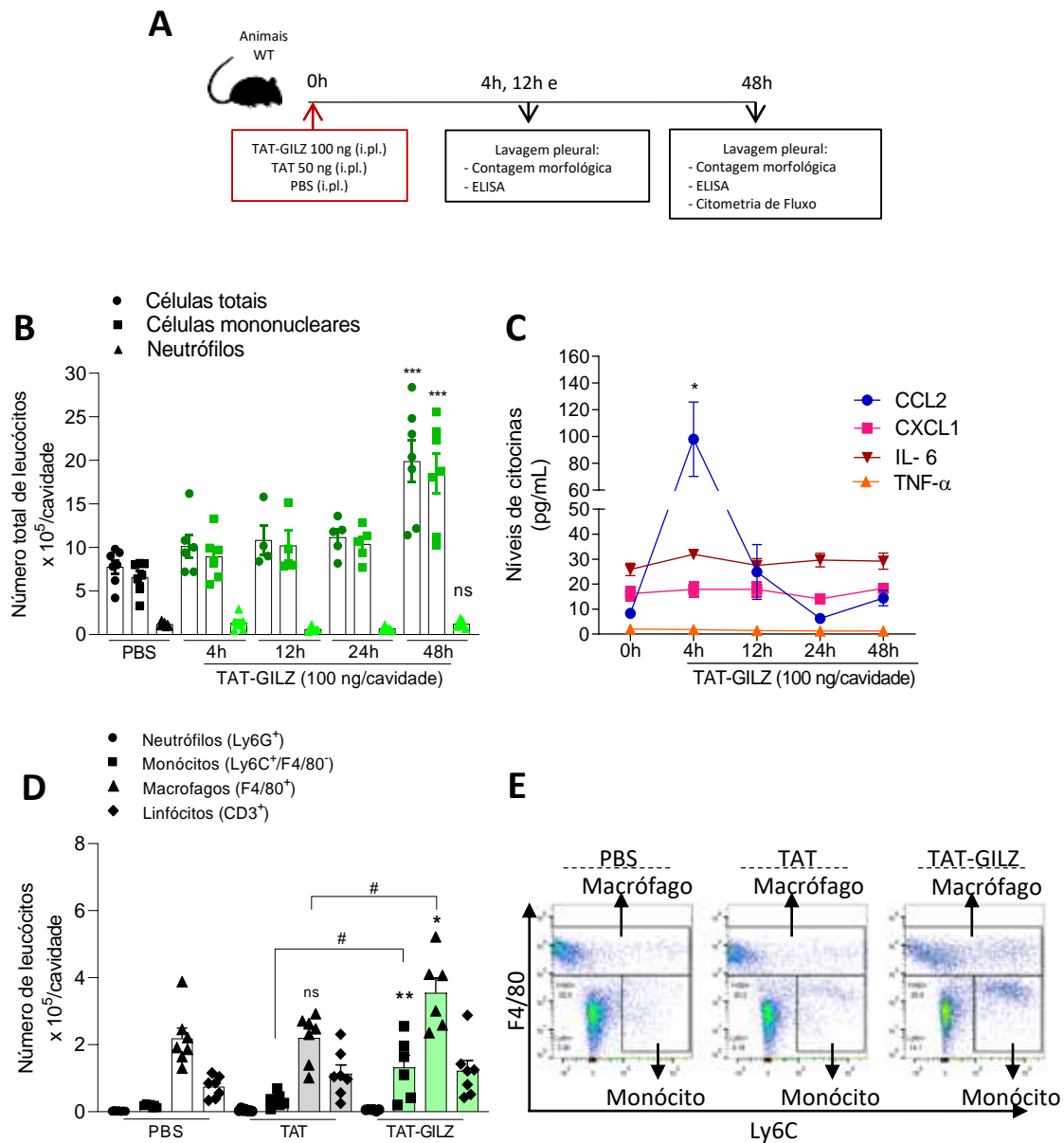


Figura 6 – TAT-GILZ induz recrutamento de monócitos/macrófagos para cavidade pleural de animais de forma tempo-dependente e associado ao aumento dos níveis da quimiocina CCL2. Camundongos C57BL/6 receberam uma injeção intrapleural (i.p.) de TAT-GILZ (100 ng/cavidade) ou PBS (controle) – desenho experimental (A), e as células recrutadas para a cavidade foram coletadas após 4, 12, 24 e 48 horas para contagem total e diferencial de leucócitos por microscopia óptica (B). Os níveis de IL-6, TNF- α , CXCL1 e CCL2 foram mensurados por ELISA nos sobrenadantes do lavado pleural (C). A análise de citometria de fluxo de leucócitos coletados 48 horas após a injeção de TAT, TAT-GILZ ou PBS também foi realizada (D-E). São apresentados gráfico de número de leucócitos (D) e *Dot plots* representativos (E). Os resultados são apresentados como média \pm SEM (gráficos B n= 5-7, C n= 5, D e E n= 6-7), *

para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$ - quando comparado ao controle (PBS), # para $< 0,05$ – quando comparado ao controle TAT, por one-way ANOVA.

Vale ressaltar que, assim como no ensaio *in vitro*, a proteína de fusão TAT não apresentou efeito indutor na migração de leucócitos *in vivo* e também não apresentou alteração nos níveis de citocinas e quimiocinas. Os dados relacionados ao efeito de TAT estão disponibilizados a seguir.

In vivo

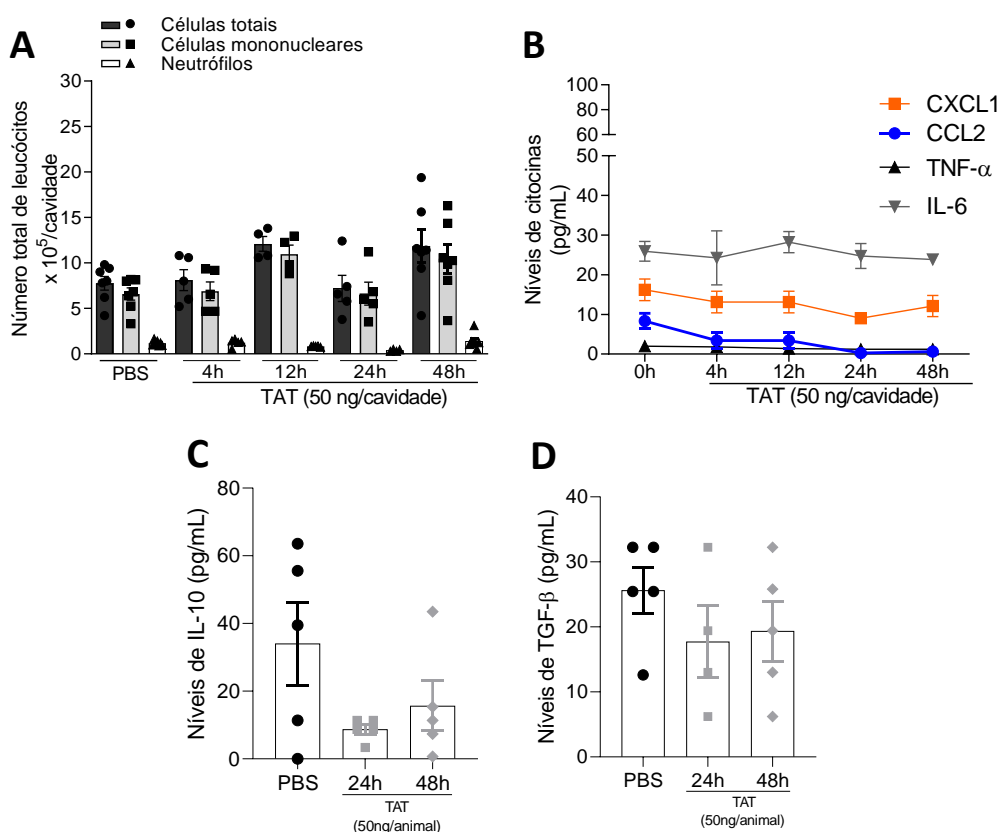


Figura 7 – Efeitos causados pela proteína de fusão TAT *in vivo*. O gráfico A representa a cinética de migração de leucócitos para a cavidade pleural de animais C57BL/6 desencadeada pela injeção de TAT. As citocinas inflamatórias e quimiocinas foram dosadas no exsudato pleural dos camundongos nos diferentes tempos (B), assim como citocinas anti-inflamatórias (C-D). Os resultados são expressos através da média \pm SEM.

5.4 TAT-GILZ induz o recrutamento de macrófagos via CCR2

Dada a importância da sinalização canônica induzida pela quimiocina CCL2 para recrutamento de células mononucleares (Kuziel, Morgan et al. 1997), investigamos se o recrutamento de macrófagos, induzido por TAT-GILZ, foi dependente da ativação de CCR2. Para isso, utilizamos um antagonista desse

receptor, o RS504393, que foi administrado por via intraperitoneal 1h antes da injeção de TAT-GILZ.

Observou-se que o pré-tratamento com o antagonista RS504393, diminuiu o recrutamento de leucócitos para a cavidade pleural dos camundongos (Figura 8A), com conseqüente redução significativa no número de macrófagos (Figura 8B). Também pode-se observar uma tendência de diminuição no número de linfócitos recrutados para cavidade (Figura 8C), contudo, não houve alteração na migração de neutrófilos (Figura 8D) como observado anteriormente.

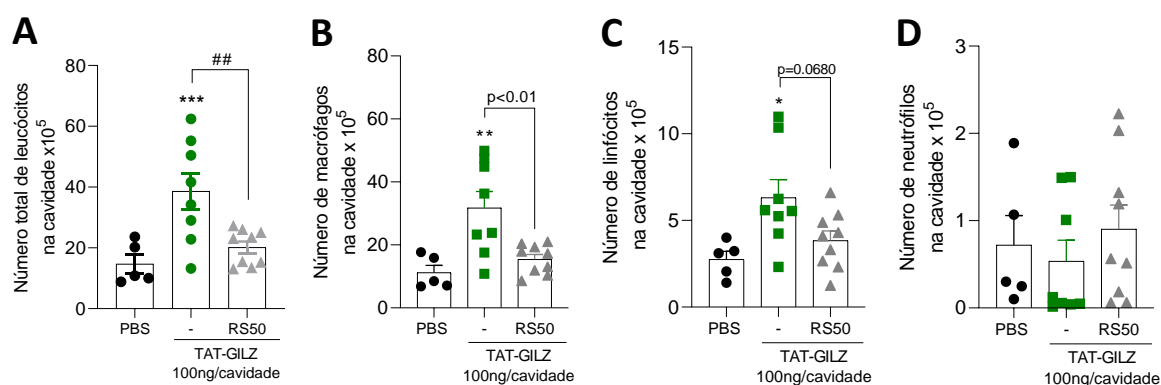


Figura 8 – Efeito do receptor CCR2 na migração de macrófagos induzida por TAT-GILZ. Animais WT foram pré-tratados intraeritonealmente (i.p.) com o antagonista seletivo de CCR2 (RS504393 – 2mg/Kg) 1h antes da injeção de TAT-GILZ (100ng) ou PBS e após 48h foram eutanasiados. Os exsudatos foram colhidos e procedeu-se a contagem das células através das características morfológicas de cada população. Quantificação do número total de leucócitos (A), macrófagos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D). Os dados são média \pm SEM de N = 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo PBS, por one-way ANOVA.

A redução do recrutamento de macrófagos através do efeito do RS504393 foi acompanhada, inicialmente, de menores níveis de CCL2 sugerindo que o eixo CCL2/CCR2 possui um papel importante na migração de células mononucleares, *in vivo*, induzidas por essa proteína.

5.5 Macrófagos recrutados por TAT-GILZ apresentam fenótipos resolutivos/regulatórios

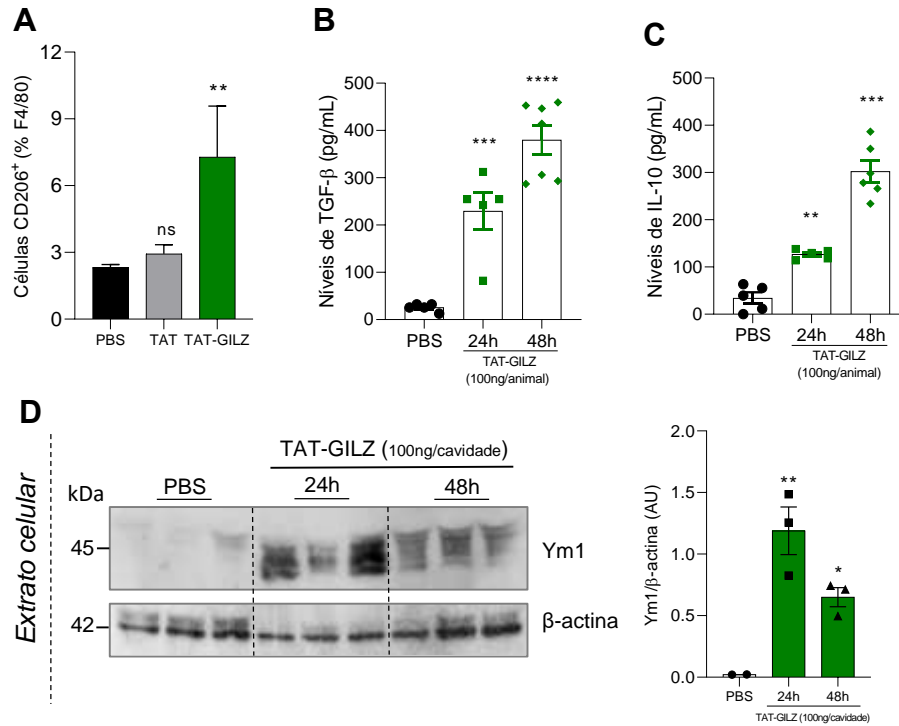
De posse desses resultados, avaliamos em seguida qual seria o perfil fenotípico das células recrutadas. Com esse intuito, utilizamos citometria de fluxo para imunofenotipagem celular, análise da expressão de proteínas por western blot e também avaliamos a liberação de citocinas. Podemos observar, na Figura

9A, que TAT-GILZ induziu um aumento da frequência de macrófagos positivos para CD206, um marcador de macrófagos M2 que confere às células fenótipos envolvidos na regulação/resolução da inflamação (Korns, Frasch et al. 2011). Além disso, também foi observado que a expressão de Ym1, um marcador clássico de macrófagos M2, teve sua expressão aumentada nos tempos de 24 e 48h pós estímulo (Figura 9D). De forma interessante, a injeção de TAT-GILZ promoveu a liberação de maiores níveis de citocinas anti-inflamatórias/pró-resolutivas IL-10 e TGF- β , atingindo o pico de liberação no tempo de 48h (Figuras 9B-C).

Em consonância com nossos resultados *in vivo*, experimentos conduzidos *in vitro* mostraram que TAT-GILZ induz a liberação de IL-10 e TGF- β em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) (Figura 9E-F) e aumentou a fosforilação de STAT3 (Figura 9G), uma via de sinalização importante para indução do fenótipo M2 em macrófagos em diferentes contextos (Shiraishi, Fujiwara et al. 2012, Mu, Shi et al. 2018, Yao, Li et al. 2018, Degboé, Rauwel et al. 2019, Vago, Sugimoto et al. 2019). Nota-se, ainda, que o tratamento com TAT também induz a liberação de IL-10 e TGF- β *in vitro* (avaliados no tempo de 48h), porém em níveis expressivamente menores que os induzidos por TAT-GILZ (Figura 9E-F).

Dessa forma, nossos dados sugerem que TAT-GILZ foi capaz de promover migração de células mononucleares para cavidade pleural dos animais e, induziu o fenótipo regulatório dos macrófagos.

In vivo



In vitro

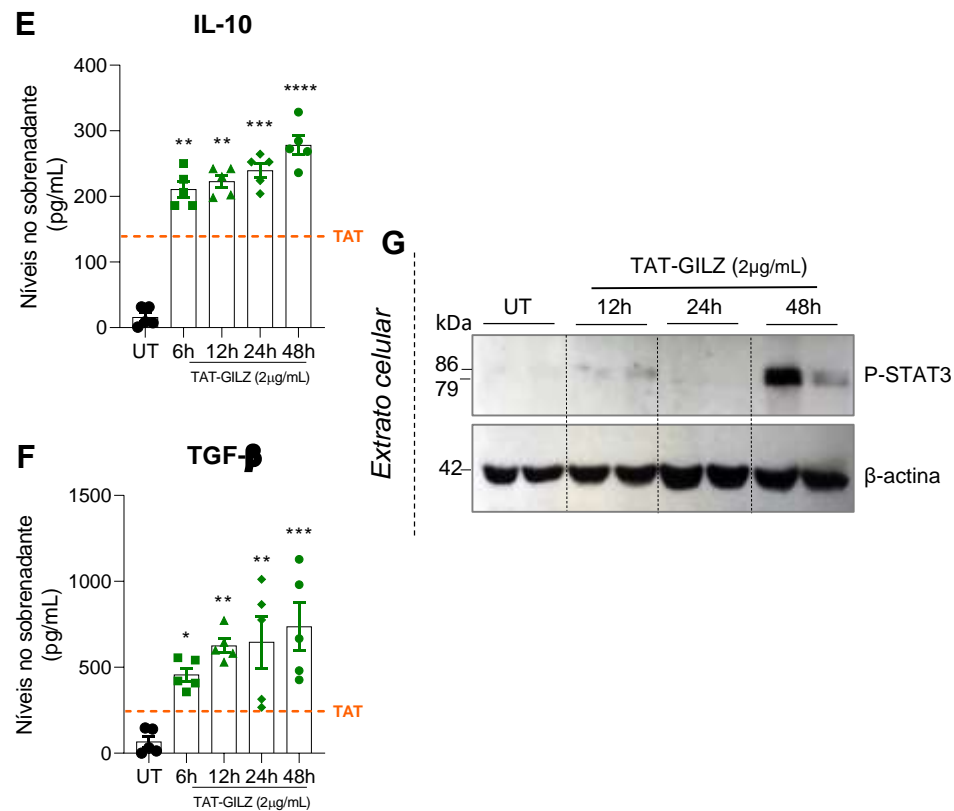


Figura 9 – Perfil dos macrófagos recrutados para cavidade pleural dos animais e citocinas produzidas após estímulo com TAT-GILZ. Camundongos C57BL/6 receberam uma dose i.pl. de TAT-GILZ (100 ng/cavidade) ou PBS (controle), e os macrófagos recrutados para a cavidade foram coletados após 48 horas para imunofenotipagem por citometria de fluxo e análise da expressão de proteínas. Adicionalmente foram realizados ensaios de cinética de tratamento com TAT-GILZ *in vitro*. O gráfico apresentado na letra **A** representa o número de macrófagos recrutados para a cavidade que se mostraram positivos para o marcador CD206. Os níveis de IL-10 e TGF- β foram avaliados no sobrenadante da lavagem pleural de camundongos injetados com TAT-GILZ em diferentes pontos de tempo pós-injeção (**B-C**). Os leucócitos recrutados na cavidade pleural foram processados para análise dos níveis de Ym1 por Western blot (**D**). A β -Actina foi usada como para normalização dos Blots. Durante os ensaios *in vitro*, a cinética de produção de IL-10 e TGF- β por BMDMs foi avaliada (**E-F**). A linha tracejada representa os níveis médios das citocinas após 48 horas de tratamento com TAT. Os níveis de P-STAT3 também foram avaliados (**G**). Os dados são apresentados como média \pm SEM de 5-6 camundongos por grupo (*in vivo*) ou são resultados representativos de 2 experimentos independentes com BMDMs realizados em quadruplicados biológicas (n = 4). A quantificação de Western blot foi realizada usando o software ImageJ representatos em **D**, que usaram extratos de células de 3 camundongos. * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (PBS) por one-way ANOVA.

5.6 GILZ é importante para o recrutamento de células mononucleares, depuração bacteriana e eferocitose

Dada a relevância funcional de GILZ na migração e polarização de macrófagos, nosso próximo objetivo foi avaliar a influência endógena desse peptídeo na migração de células mononucleares em um modelo auto-resolutivo de peritonite induzido por *E. coli*. Este é um modelo experimental de inflamação aguda, em que o hospedeiro WT consegue naturalmente lidar com a infecção desenvolvendo uma resposta inflamatória ideal com consequente termino da inflamação (Chiang, Fredman et al. 2012, Zaidan, Tavares et al. 2022). Dessa forma, a fase resolutive acontece de forma espontânea no tempo de 48h e é acompanhada por aumento de células mononucleares, característico desse processo.

Assim, utilizamos animais do tipo selvagem (WT) e animais deficientes para o gene GILZ (GILZ^{-/-}) e comparamos a cinética de infiltração de leucócitos no peritônio após o desafio com *E. coli* 10⁶ (desenho experimental – Figura 10A). Observamos que em ambos os genótipos houve uma migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais em resposta a infecção com cinéticas

similares. No entanto, os animais $GILZ^{-/-}$ apresentaram menor recrutamento de leucócitos no tempo de 48h (Figura 10B), que foi refletida pela diminuição do recrutamento de monócitos/macrófagos e linfócitos (Figura 10C-D) sem efeito dos genótipos no perfil de migração de neutrófilos (Figura 10E). De forma interessante, o menor número de células mononucleares recrutadas nos animais $GILZ^{-/-}$ após desafio com *E. coli*, foi associado à menores níveis da quimiocina CCL2 (Figura 10F), maiores contagens bacterianas na cavidade (Figura 10G) e menores porcentagens de neutrófilos apoptóticos e eferocitose (Figura 10H), quando comparados aos animais WT.

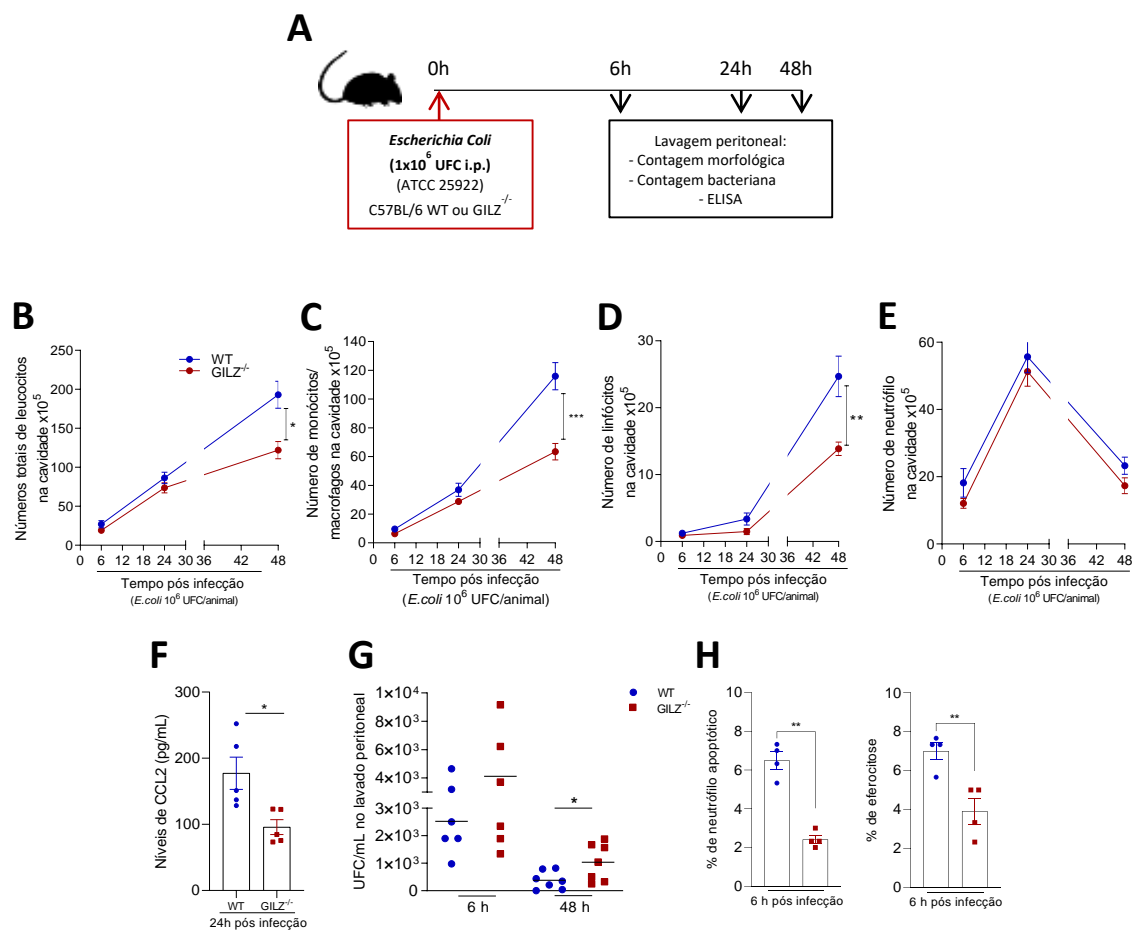


Figura 10 – Efeito da deficiência gênica de GILZ no recrutamento de células mononucleares no modelo auto-resolutivo de peritonite induzido por *Escherichia coli*.

Camundongos WT e $GILZ^{-/-}$ foram infectados com *E. coli* (1 x 10⁶ UFC) e as células foram coletadas nos tempos de 6, 24 e 48 horas pós infecção – esquema experimental (A). O número de leucócitos totais (B), macrófagos (C), linfócitos (D) e neutrófilos (E) foram avaliados em diferentes momentos pós-infecção. Os níveis de CCL2 foram mensurados nos sobrenadantes isentos de células das lavagens peritoneais 24 horas pós infecção (F). (G) O gráfico mostra os números de UFC nos lavados de de 6 e 48 horas após a infecção (n = 5-7). A porcentagem de neutrófilos apoptóticos e eferocitose (% de macrófagos contendo corpos apoptóticos) foram avaliados a partir de contagens em lâminas de citospin (H). Os dados são apresentados como

média \pm SEM, * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$, por two-way ANOVA (**B-E**) ou teste t ao comparar 2 grupos (**F-H**).

Em resumo, os dados sugerem que GILZ participa do recrutamento de macrófagos, células essenciais para o processo resolutivo e, sugerindo que após estímulos inflamatórios mais intensos sua ausência possa culminar em uma progressão não ordenada do término da inflamação.

5.7 A ausência de GILZ promove a diminuição da expressão de marcadores pró-resolutivos em macrófagos

Nosso próximo passo foi avaliar se a ausência do gene GILZ afetaria o perfil fenotípico dos leucócitos recrutados durante a fase resolativa da peritonite por *E. coli*.

Para tal, foram realizados experimentos de citometria de fluxo utilizando-se os marcadores F4/80, que caracterizam macrófagos, Ly6G que caracterizam neutrófilos, além das marcações para a população de monócitos (Ly6C) e linfócitos T (CD3). O fenótipo de macrófagos foi avaliado conforme populações previamente identificadas (Schif-Zuck, Gross et al. 2011, Vago, Sugimoto et al. 2019).

Em consonância com os dados das contagens morfológicas, neste modelo experimental a deficiência gênica de GILZ não modifica a população de neutrófilos (Ly6G⁺) recrutadas para a cavidade dos animais no tempo avaliado (Figura 11A). No entanto, foi possível observar uma diminuição das populações de monócitos (Figura 11B) e linfócitos (CD3⁺) (Figura 11D) nos animais GILZ^{-/-} quando comparados aos WT. Quanto aos macrófagos, foi observado uma dispersão muito grande dos dados, não sendo possível detectar diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos experimentais (Figura 11C). A falta de GILZ não alterou o número de macrófagos classicamente ativados M1 (F4/80^{low}/Ly6C⁺/CD11b^{med}) – Figura 11E, no entanto, comprometeu o número de macrófagos do fenótipo M2 (F4/80^{hi}/Ly6C⁻/CD11b^{hi}) e Mres (F4/80^{med}/CD11b^{low}) encontrados no peritônio dos camundongos GILZ^{-/-} (Figura 11F-G), quando comparados aos animais WT. Também podemos observar uma diminuição na expressão do receptor de manose (CD206) nos animais GILZ^{-/-} (Figura 11H), reforçando a hipótese de que GILZ é importante para reprogramação de macrófagos para fenótipos regulatórios.

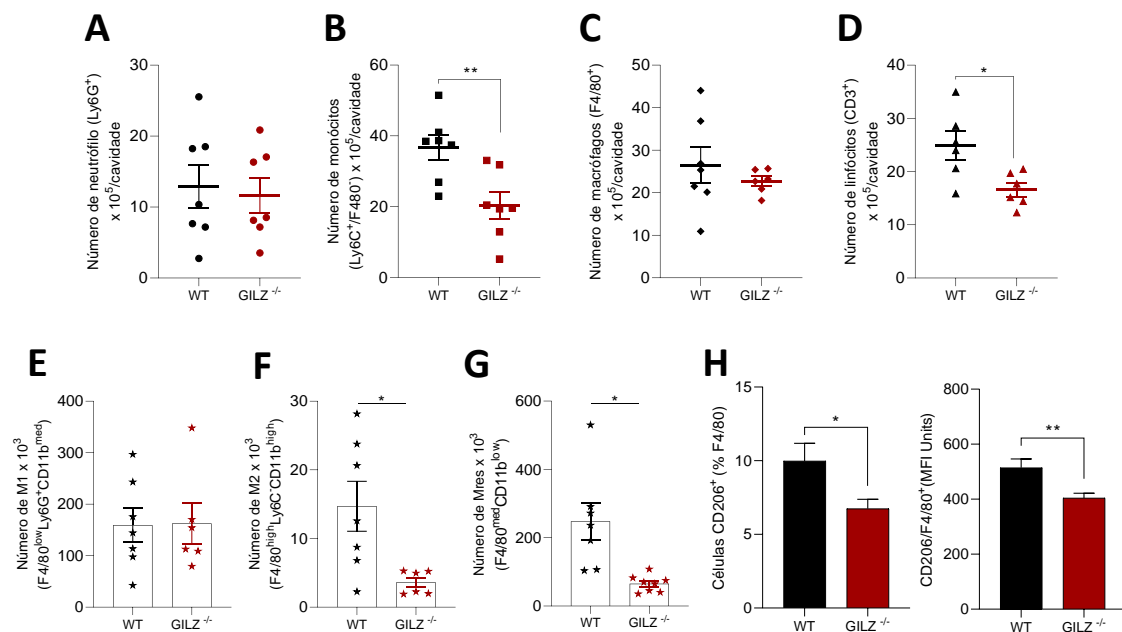


Figura 11 – Efeito da deficiência gênica de GILZ no fenótipo de macrófagos no modelo auto-resolutivo de peritonite induzido por *E. coli*. A análise de citometria de fluxo da população de leucócitos recrutados para a cavidade peritoneal dos animais foi realizada após 48 horas da infecção por *E. coli*. Figura **A** representa o número absoluto de neutrófilos (F4/80⁻/Ly6G⁺), **B** monócitos (F4/80⁻/Ly6C⁺), **C** macrófagos (F4/80⁺/CD11b⁺) e **D** linfócitos (CD3⁺). As subpopulações dos macrófagos classificadas em M1 (F4/80^{low}/Ly6C⁺/CD11b^{med}), M2 (F4/80^{high}/Ly6C⁻/CD11b^{high}) e Mres (F4/80^{med}/CD11b^{low}) também foram analisadas e expressas em número absoluto (**E-G**). As frequências de macrófagos CD206⁺ e a média de intensidade de fluorescência (MFI) são representadas graficamente em **H**. Os resultados são mostrados como a média ± SEM de n = 5-6 camundongos. * para p < 0,05, ** para p < 0,01 quando comparado ao grupo WT, por teste t.

5.8 A ausência de GILZ afeta a capacidade fagocitária de macrófagos e esta função é restaurada pelo pré-tratamento com TAT-GILZ

Uma vez que os camundongos GILZ^{-/-} apresentaram maiores contagens bacterianas no lavado peritoneal e números reduzidos de monócitos/macrófagos, avaliamos se o GILZ endógeno impactaria na capacidade fagocitária dos macrófagos, por meio de ensaio *in vitro* com o propósito de eliminarmos o viés do número de células recrutadas. Assim, BMDMs e macrófagos peritoneais de camundongos GILZ^{-/-} ou WT foram infectados com

2×10^6 UFC de *Escherichia coli* por 3 h, e a fagocitose foi avaliada como mostrado no esquema experimental da Figura 12A. Curiosamente, em ambos tipos celulares, os animais GILZ^{-/-} mostraram um número significativamente menor de bactérias internalizadas e da porcentagem de fagocitose do que células de camundongos WT (Figura 12B-C).

Avaliamos em seguida se TAT-GILZ poderia aumentar diretamente a fagocitose de *E. coli* pelos macrófagos. Para isso, BMDMs de animais WT foram pré-tratados com TAT (1 µg/mL) ou TAT-GILZ (2 µg/mL) por 18h, seguido da infecção com 2×10^6 UFC de *E.coli* por 3 h, sendo a fagocitose avaliada como acima (Figura 12A) e as bactérias fagocitadas quantificadas.

O pre-tratamento com TAT-GILZ promoveu um aumento da fagocitose das bactérias em comparação com as células tratadas com veículo ou com TAT (Figura 12D). Também nos perguntamos se TAT-GILZ seria capaz de restaurar a função fagocitária de macrófagos deficientes no gene GILZ. Então procedemos com o protocolo experimental tratando os BMDMs de GILZ^{-/-} com a proteína TAT-GILZ utilizando o mesmo protocolo descrito acima. De forma interessante, TAT-GILZ foi capaz de restaurar a função fagocítica dos macrófagos de animais GILZ^{-/-} para valores similares aos encontrados nos macrófagos de animais WT (Figura 12E).

Em seguida foi avaliado se GILZ poderia apresentar ação antibacteriana direta. Assim, discos impregnados com TAT, TAT-GILZ ou com o antibiótico gentamicina (10 µg) foram adicionados em placas de ágar Miller Hinton (MH) após semeadura com *E.coli*. Após 18h de incubação à 37°C e 5% CO₂ as placas foram avaliadas. Como esperado, a gentamicina apresentou um halo de inibição para esta cepa de *E. coli*, enquanto TAT ou TAT-GILZ nas concentrações utilizadas no ensaio não apresentaram halos de inibição, sugerindo que TAT-GILZ não tenha efeito inibitório direto no crescimento bacteriano (Figura 12F).

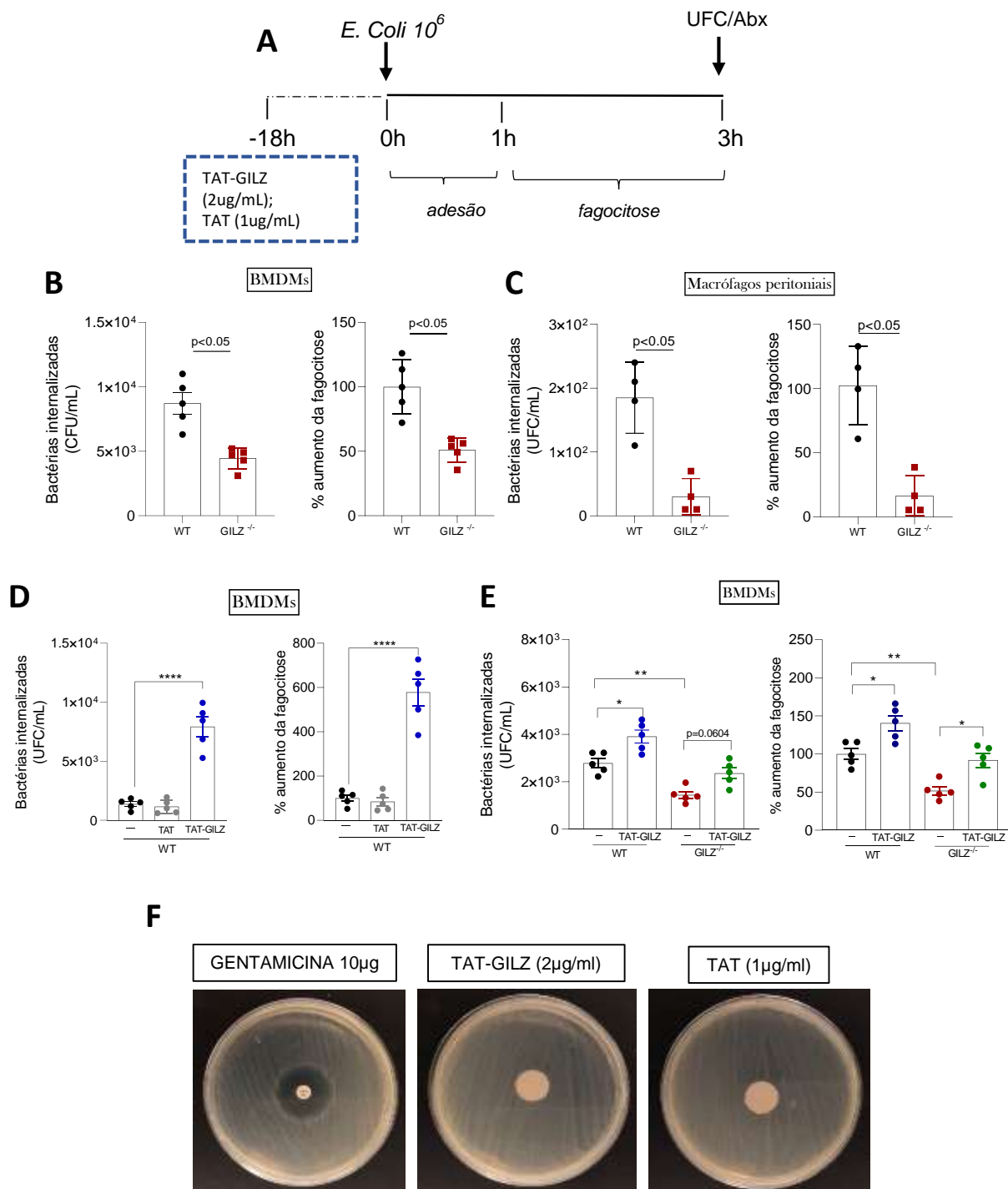


Figura 12 – Efeito de GILZ na fagocitose de *E. coli*. Fagocitose de bactérias - protocolo experimental (A) - foram avaliadas em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) (B) ou macrófagos peritoneais (C) obtidos de camundongos WT ou *GILZ*^{-/-}. Macrófagos de animais WT (2×10^5 células/poço) foram pré-tratados com TAT (1 μ g/mL) ou TAT-GILZ (2 μ g/mL) por 18 h (D) e depois incubados com *E. coli* (MOI 1:10) por 3 h para permitir a adesão e posterior fagocitose. As bactérias não internalizadas foram removidas pela incubação das células com

gentamicina (Abx), seguida da lise dos macrófagos e plaqueamento em ágar MacConkey (McC) para identificar o número de bactérias fagocitadas viáveis. Em um experimento paralelo, BMDMs de camundongos GILZ^{-/-} foram pré-tratados com TAT-GILZ e submetidos à fagocitose conforme descrito acima (E). Os resultados são expressos como UFC de bactérias internalizadas ou % de fagocitose (contagens de UFC em placas de ágar McC, N=4-5) e são apresentados como média ± SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ao comparar células tratadas com TAT-GILZ com veículo ou TAT, por one-way ANOVA (D-E). A comparação entre BMDMs de WT e GILZ^{-/-} foi por teste t (* $p < 0,05$). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicatas ou quintuplicatas biológicas. TAT-GILZ (2 µg/mL), TAT (1 µg/mL) ou gentamicina (controle) impregnados em filtros estéreis foram então adicionados a placas de ágar MH contendo *E. coli*. A zona de inibição de crescimento foi avaliada após incubação por 18h à 37°C (F).

Juntos, esses dados sugerem que GILZ pode auxiliar nas defesas do organismo estimulando mecanismos de fagocitose em macrófagos. Embora não testado aqui, podemos sugerir que o tratamento combinado de TAT-GILZ com antimicrobianos pode ser uma estratégia terapêutica potencial para aumentar a resistência do hospedeiro as infecções. Além disso, GILZ endógeno participa ativamente da fase resolutive da inflamação, atuando no recrutamento e polarização de macrófagos para o fenótipo regulatório M2/Mres com consequente liberação de citocinas anti-inflamatórias/pró-resolutivas.

6 DISCUSSÃO

A inflamação aguda localizada faz parte da resposta protetora normal do hospedeiro à lesão tecidual e infecção por patógenos microbianos invasores (Nathan 2002). A ativação da resposta inflamatória é essencial e é mediada, inicialmente, por células imunes residentes que liberam mediadores solúveis, como citocinas inflamatórias, que, em seguida, ativam vias pró-inflamatórias (Abdulhaleq, Assi et al. 2018). Concomitantemente, ocorre a regulação positiva de moléculas de adesão celular em leucócitos circulantes e células endoteliais, promovendo o influxo de granulócitos e fagócitos mononucleares do sangue para o local acometido (Yuan, Shen et al. 2012, Wright, Gibson et al. 2016). Esse processo visa, exclusivamente, eliminar o agente indutor da inflamação e conduzir a resposta inflamatória à sua próxima fase, a resolução (Serhan 2007). Por isso, a fase resolutive da inflamação é um evento ativo, coordenado e fundamental para o *clearance* do microambiente inflamatório, no qual as células recrutadas na fase inicial da inflamação deverão, necessariamente, ser digeridas/efericitadas tendo como principal propósito fisiológico o retorno da homeostase tecidual e o término da inflamação (Buckley, Gilroy et al. 2013). Além disso, vias endógenas ativadas durante o estágio final das reações de defesa podem contra regular a inflamação e promover a resolução (Serhan and Savill 2005).

Sabemos que embora essa resposta inflamatória desencadeada frente à uma série de estímulos nocivos seja protetora para o hospedeiro, se ativada e mantida de forma descontrolada, pode resultar em uma ampla gama de distúrbios inflamatórios agudos, crônicos e sistêmicos (Riccardi, Levi-Schaffer et al. 2018).

Nesse contexto, nos últimos anos, as pesquisas têm se concentrado no entendimento das origens das doenças inflamatórias e autoimunes crônicas com intuito de buscar alternativas terapêuticas para tratamento das mesmas. Contudo, as terapias farmacológicas utilizadas atualmente são destinadas a interromper a síntese ou ação de mediadores produzidas durante a fase inicial da inflamação. No entanto, existe um interesse crescente com a outra extremidade do espectro inflamatório – o processo de resolução, um requisito crítico para o término da resposta inflamatória, com o objetivo de desenvolver

terapias pró-resolutivas que conduzam ao termino da inflamação e sua resolução (Sousa, Alessandri et al. 2013).

Assim, enquanto atualmente o tratamento da inflamação se baseia em inibir os eventos da fase produtiva do processo inflamatório, incluindo a inibição do influxo de leucócitos, a “farmacologia da resolução” propõe a indução de mediadores e moléculas e ativação de vias intracelulares naturais da fase resolutiva da inflamação (Perretti, Leroy et al. 2015). Essa estratégia beneficiaria o recrutamento e ação de células mononucleares, especialmente macrófagos promotores de resolução.

Dessa forma, o estudo dos mecanismos da resposta resolutiva e as interações existentes entre todo processo inflamatório, tem levado à constante descoberta de novos mediadores participantes desse processo (Headland and Norling 2015). De forma interessante, algumas moléculas com características pró-resolutivas, como a plasmina (Carmo, Costa et al. 2014, Sugimoto, Ribeiro et al. 2017), a anexina A1 (Vago, Nogueira et al. 2012, Sugimoto, Vago et al. 2016, Galvão, Vago et al. 2017, Lima, Vago et al. 2017, Perucci, Sugimoto et al. 2017) e a angiotensina(1-7) (Zaidan, Tavares et al. 2022) foram descritas como novos mediadores pró-resolutivos, por agirem em eventos chaves da resolução como, por exemplo, no recrutamento de células mononucleares e modulação do fenótipo de macrófagos.

Além desses mediadores citados acima, GILZ, um peptídeo induzido por glicocorticoides (GC) contendo zíper de leucina, tem sido estudado em diferentes contextos relacionados a inflamação (Cannarile, Cuzzocrea et al. 2009, Beaulieu and Morand 2011, Hoppstädter, Kessler et al. 2015, Ricci, Ronchetti et al. 2019, Vago, Galvão et al. 2020, Bruscoli, Febo et al. 2021). Inicialmente, foi mostrado que GILZ está envolvido na modulação das mesmas vias relacionadas aos efeitos anti-inflamatórios induzidos por GC, inibindo as vias clássicas da inflamação (NF- κ B e AP-1) (Ayroldi, Migliorati et al. 2001, Bruscoli, Febo et al. 2021). Com o avanço das pesquisas e o interesse em estudar possíveis ações pró-resolutivas dessa proteína, estudos foram conduzidos afim de fornecer evidências do efeito de GILZ na resolução da inflamação.

VAGO e colaboradores (2015) mostraram em um modelo auto-resolutivo de pleurisia induzido por LPS, que a expressão de GILZ é aumentada durante a fase resolutiva da inflamação e que a administração de TAT-GILZ (proteína de

fusão à GILZ permeável às células), no pico da inflamação, promove uma diminuição do número de neutrófilos viáveis e aumenta o número de neutrófilos apoptóticos (Vago, Tavares et al. 2015). Além disso, foi relatado posteriormente que além de promover a apoptose de neutrófilos (Vago, Tavares et al. 2015, Espinasse, Pépin et al. 2016) GILZ induz outros eventos resolutivos chave, incluindo a reprogramação de macrófagos e eferocitose, os quais são marcadores de uma resolução eficiente (Vago, Galvão et al. 2020).

Embora tenha se progredido no entendimento das propriedades pró-resolutivas de GILZ, é preciso explorar ainda mais as ações desse peptídeo em outros eventos celulares importantes para o processo de resolução, como, por exemplo, o recrutamento de células mononucleares. Assim, foram realizados ensaios utilizando experimentação *in vitro* e *in vivo*, visando esclarecer os efeitos exercidos pela proteína TAT-GILZ na migração de monócitos/macrófagos.

Dessa forma, por meio de experimentos exploratórios utilizando culturas de células RAW 264.7 (macrófagos murinos), submetidos ao ensaio de quimiotaxia, foi possível observar que TAT-GILZ induz quimiotaxia de macrófagos de forma dose-dependente, ou seja, a maior concentração de TAT-GILZ (2µg/mL) utilizada no experimento recrutou maior quantidade de células. Também foi observado que TAT-GILZ influenciou somente na migração de macrófagos, visto que não foi capaz de promover quimiotaxia de neutrófilos humanos. Vale ressaltar que, em modelos experimentais de inflamação aguda a administração do peptídeo TAT-GILZ modula negativamente a migração de neutrófilos para o ambiente inflamatório (Vago, Tavares et al. 2015, Vago, Tavares et al. 2020, Souza, Carvalho et al. 2022) e induz mecanismos de morte celular nesses leucócitos. De fato, TAT-GILZ induz a apoptose de neutrófilos por meio da desativação de vias de sobrevivência, como MCL-1 (Vago, Tavares et al. 2015). Em consonância com o efeito de GILZ na desativação de neutrófilos, em um modelo de colite induzida por ácido dinitrobenzeno sulfônico (DNBS), a ausência de GILZ resultou em um estado inflamatório excessivo com ativação persistente de neutrófilos (Ricci, Ronchetti et al. 2019). Esses fatos sugerem que GILZ age desativando o neutrófilo, uma vez que a migração em direção a um ambiente quimiotático é uma característica de ativação neutrofílica. Portanto, essa proteína parece exercer uma ação seletiva na indução da migração de leucócitos, agindo primordialmente em células mononucleares.

A partir dessa evidência, seguimos para os ensaios *in vivo*, com camundongos desafiados por injeção intrapleural com a proteína TAT-GILZ e as amostras coletadas por lavado pleural, nos tempos determinados. De forma interessante, e de maneira a confirmar os resultados obtidos durante os ensaios *in vitro*, TAT-GILZ foi capaz de induzir de forma significativa o recrutamento de leucócitos no tempo de 48 horas pós injeção. Através das contagens pleurais das lâminas de citospin e a análise de citometria de fluxo, foi demonstrado que a população celular recrutada foi majoritariamente composta de células mononucleares não havendo interferência no recrutamento de neutrófilos e linfócitos quando comparada a camundongos injetados com PBS. Além disso, TAT-GILZ promoveu aumento da população de monócitos (F4/80⁻/Ly6C⁺) e macrófagos (F4/80⁺) em relação aos animais desafiados somente com TAT, sugerindo que esse efeito seja exclusivo de GILZ. Dessa forma, pode-se dizer que o recrutamento induzido por TAT-GILZ foi específico de células mononucleares, com foco na população de monócitos/macrófagos. Além disso, durante a cinética de recrutamento, TAT-GILZ não promoveu aumento de citocinas envolvidas na resposta pró-inflamatória, porém, os níveis de CCL2 aumentaram 4h após a injeção, intervalo que antecede o recrutamento de macrófagos para cavidade pleural dos animais. Essa quimiocina é responsável por induzir o recrutamento de monócitos e a ativação de subpopulações de linfócitos T (Daly and Rollins 2003, Dalli and Serhan 2017), através da ligação a seu receptor específico, o CCR2. Essa ligação promove tanto a egressão de monócitos da medula óssea para a corrente sanguínea (Serbina and Pamer 2006) quanto a migração de células mononucleares do sangue para os tecidos (Kurihara, Warr et al. 1997).

Para avaliar o papel de CCR2 na migração de macrófagos *in vivo* promovida por TAT-GILZ, animais C57BL/6 foram pré-tratados com antagonista seletivo de CCR2 (RS504393) 1 hora antes da injeção da proteína. Observou-se que o bloqueio farmacológico do receptor inibiu a migração celular induzida por TAT-GILZ, sugerindo que o eixo CCL2/CCR2 possui um papel importante nesse contexto e reforçando a hipótese que TAT-GILZ induz um aumento da liberação de CCL2 que por sua vez se liga ao seu receptor CCR2, promovendo assim a migração celular de monócitos de forma não inflamatória.

A migração celular requer eventos específicos da cascata de sinalização intracelular e GILZ mostrou interagir fisiologicamente com vários fatores de transcrição e vias de sinalização, exercendo um papel crucial no controle do tráfego de proteínas e na sinalização de uma resposta inflamatória (VAGO et al., 2021; BRUSCOLI; RICCARDI; RONCHETTI, 2021).

Em estudos publicados pelo nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado os efeitos desencadeados por moléculas pró-resolutivas na indução da migração celular de leucócitos e as vias de sinalização participantes desse processo. Como exemplo, Ang(1-7), um peptídeo que se liga ao receptor Mas, promoveu o recrutamento de macrófagos através da fosforilação de ERK1/2 e produção de CCL2, promovendo um recrutamento não flogístico de monócitos para pleura dos animais. Também não foi evidenciado a participação de citocinas pró-inflamatórias no processo. Além disso, os macrófagos recrutados para a cavidade dos camundongos possuíam fenótipos resolutivos/reguladores, com aumento da população M2 e Mres, expressão de proteínas relacionadas ao fenótipo M2 e citocinas anti-inflamatórias e pró-resolutivas (Zaidan, Tavares et al. 2022). Plasmina e db-cAMP um mimético do AMPc, também induziram migração de monócitos de uma maneira dependente do eixo CCL2/CCR2. Além disso, o db-cAMP promoveu a reprogramação de macrófagos derivados da medula óssea para um fenótipo M2, conforme observado pelo aumento da expressão de Arg-1/CD206/Ym-1 e dos níveis de IL-10 (Carmo, Costa et al. 2014, Negreiros-Lima, Lima et al. 2020).

Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar o fenótipo dos macrófagos recrutados para a cavidade dos animais desafiados com TAT-GILZ. Por meio da expressão de CD206, um receptor de manose evolido no fenótipo de macrófagos do tipo M2, foi possível avaliar aumento da indução desse marcador nos animais que receberam a injeção de TAT-GILZ, assim como aumento da expressão de Ym-1. De interesse, o marcador CD206 é necessário para o engolfamento de corpos apoptóticos (Korns, Frasch et al. 2011). As citocinas anti-inflamatórias e pró-resolutivas, IL-10 e TGF- β , foram liberadas durante os ensaios *in vitro* e *in vivo*. Além disso, TAT-GILZ também induziu a fosforilação de STAT3. Dessa forma, os dados sugerem que TAT-GILZ promove a polarização de macrófagos para fenótipos regulatórios, associado à fosforilação de STAT3 e liberação de IL-10 e TGF- β . Importante ressaltar que o aumento de

IL-10 produzida por macrófagos está associado à ativação de P-STAT3 e eferocitose durante a resolução da inflamação (Proto, Doran et al. 2018).

Utilizado modelos auto-resolutivos *in vivo* os macrófagos podem ser classificados nos fenótipos M1, M2 e Mres, também conhecidos como macrófagos ativados de forma clássica ou alternativa, e macrófagos pró-resolutivos, respectivamente (Ariel and Serhan 2012, Vago, Tavares et al. 2015). De fato, os perfis funcionais dos macrófagos tem sido correlacionados com funções pró-inflamatórias (M1) e anti-inflamatórias/regulatórias (M2 e Mres). Já é bem estabelecido que macrófagos M2 liberam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e níveis muito baixos de citocinas pró-inflamatórias (Fadok, Bratton et al. 1998, Korn, Frisch et al. 2011). Assinaturas adicionais desse fenótipo, como YM1 (um membro da família das quitinases) também são identificadas (Raes, Van den Bergh et al. 2005). Macrófagos com esses perfis são protagonistas importantes na resolução da resposta inflamatória, pois promovem a fagocitose de bactérias/detritos, e eferocitose de granulócitos apoptóticos mediando respostas regenerativas dos tecidos (Korn, Frisch et al. 2011, Schiff-Zuck, Gross et al. 2011, Oishi and Manabe 2018).

É importante mencionar que a polarização de macrófagos para os fenótipos M1-M2 é um processo altamente dinâmico e pode ser revertido em condições fisiológicas e patológicas (Mosser 2003). No curso de várias situações fisiopatológicas, a mesma via de sinalização pode estar envolvida na polarização de macrófagos M1 ou M2 (Labonte, Tosello-Trampont et al. 2014). Além disso, um desbalanço de vias de sinalização e transdução de sinal, assim como da polarização M1-M2 dos macrófagos, estão associados a várias doenças inflamatórias crônicas, de origem infecciosa ou não (Wang, Liang et al. 2014).

Em um modelo de hipóxia utilizando células RAW 264.7, foi evidenciado o aumento da expressão de GILZ em monócitos/macrófagos após estimulação com citocinas envolvidas na polarização de macrófagos M2: IL-4, IL-10 e IL-13 (Berrebi, Bruscoli et al. 2003, Hoppstädter, Kessler et al. 2015). Os autores correlacionam esses achados com a hipótese de que a ativação de receptores de glicocorticóides leva à inibição de genes pró-inflamatórios associados aos fatores de transcrição NF- κ B e AP1, e GILZ leva ao aumento da expressão de genes anti-inflamatórios (Berrebi, Bruscoli et al. 2003, Hoppstädter, Kessler et al. 2015, Ronchetti, Migliorati et al. 2015, Maciuszek, Rydz et al. 2019). Ao encontro

com esses achados, Vago e colaboradores (2020), mostraram um aumento da expressão de GILZ em macrófagos estimulados com IL-4 ou o GC sintético dexametasona (ambos agentes polarizadores para o perfil M2-like), enquanto não houve aumento de GILZ após estímulo com agentes polarizadores clássicos de macrófagos do perfil M1-Like, LPS/IFN- γ .

No contexto de doenças inflamatórias crônicas, GILZ tem chamado atenção como um meio potencial de dissociar os efeitos anti-inflamatórios benéficos dos glicocorticóides de seus efeitos deletérios sobre o metabolismo celular (Beaulieu and Morand 2011). Vários estudos analisaram seu aspecto protetor na colite, em que camundongos transgênicos que superexpressam GILZ apresentaram níveis mais baixos de inflamação do cólon. Este resultado foi associado à uma diminuição no número de células Th1 e aumento no número de células Th2 induzidas pela superexpressão de GILZ (Cannarile, Cuzzocrea et al. 2009, Bruscoli, Sorcini et al. 2018). A presença de GILZ diminuiu a prevalência da doença, demonstrando assim uma ação protetora contra inflamação grave (Cannarile, Cuzzocrea et al. 2009). Em modelos animais com artrite induzida por colágeno, o silenciamento de GILZ foi associado com exacerbação da doença, ao passo que camundongos superexpressando o gene, tiveram artrite significativamente menos grave, tanto clínica quanto histologicamente, do que os animais controle (Beaulieu, Ngo et al. 2010, Ngo, Beaulieu et al. 2013). Além disso o uso da proteína de fusão TAT- GILZ tem se mostrado efetivo em atenuar a inflamação em modelos inflamatórios não infecciosos como colite (CANNARILE *et al.*, 2009; GENTILI *et al.*, 2021), pleurisia (VAGO *et al.*, 2012, VAGO *et al.*, 2020), injúria renal (BABAN *et al.*, 2018). Recentemente, nosso grupo demonstrou a eficácia do tratamento com TAT-GILZ na proteção da lesão pulmonar e letalidade induzida pela infecção, no modelo de pneumonia pneumocócica (Souza, Carvalho et al. 2022).

Embora as atividades pró-resolutivas de GILZ tenham sido descritas em vários modelos de inflamação não infecciosa, também há um esforço para entender sua ação em doenças inflamatórias infecciosas. Por exemplo, dois estudos utilizando o modelo de sepse induzida por CLP (ligadura e perfuração do ceco) em animais transgênicos que superexpressam GILZ na linhagem macrofágica, mostraram que estes animais apresentam melhores taxas de sobrevivência associada a redução nas contagens bacterianas no sangue,

aumento na fagocitose e da expressão de GILZ nas células do exsudato peritoneal (Ballegeer, Vandewalle et al. 2019, Ellouze, Vigouroux et al. 2020). Durante a lesão promovida pelo pneumococos, o tratamento com TAT-GILZ reduziu a inflamação neutrofílica e preveniu o dano pulmonar associado à infecção. Houve também aumento da população de macrófagos com consequente aumento da eferocitose e eliminação bacteriana. Em contraste, camundongos deficientes em GILZ apresentaram lesão pulmonar aguda (LPA) mais grave, caracterizada por aumento da inflamação, diminuição da eferocitose de macrófagos e dano pulmonar acentuado (Souza, Carvalho et al. 2022). Esses achados sugerem que o GILZ endógeno modula a resposta inflamatória e sua administração exógena (por meio do TAT-GILZ) favorece a resolução da inflamação.

Diante disso, buscamos estudar o efeito da abstenção de GILZ em um modelo infeccioso auto-resolutivo de peritonite, em que a migração de células mononucleares é característico da resposta inflamatória resolutive. No presente trabalho demonstramos que a deficiência em GILZ prejudicou o recrutamento de monócitos/macrófagos e linfócitos durante a fase de resolução da peritonite (48 horas), sem alterar a cinética de recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal. O número reduzido de células mononucleares foi associado com uma redução significativa dos níveis de CCL2 e contagens bacterianas mais altas nos camundongos GILZ^{-/-} em comparação aos WT. Além disso, animais deficientes em GILZ apresentaram menor quantidade de macrófagos de perfis regulatórios/resolutivos na cavidade peritoneal. Esse resultado foi demonstrado por meio da menor expressão de CD206 e menor número absoluto das populações de macrófagos do tipo M2 e Mres. Animais GILZ^{-/-} também apresentaram menor porcentagem de neutrófilos apoptóticos e eferocitose quando comparado aos animais WT.

Ainda são poucos trabalhos que exploram o efeito de GILZ em modelos infecciosos (Ballegeer, Vandewalle et al. 2019, Ricci, Ronchetti et al. 2019, Ellouze, Vigouroux et al. 2020). No estudo desenvolvido por RICCI e colaboradores (2018), utilizando um modelo de peritonite por *C. albicans*, foi demonstrado um aumento na atividade basal dos neutrófilos de animais GILZ^{-/-} que foi responsável por eliminar de forma mais eficaz o agente infeccioso, sem, no entanto, alterar o número de neutrófilos recrutados, quando comparado aos

animais WT (Ricci, Ronchetti et al. 2019). No presente estudo, também não identificamos efeito da deficiência em GILZ na migração de neutrófilos utilizando o modelo auto-resolutivo de peritonite por *E. coli*. De forma interessante, e em contraste aos achados de Ricci utilizando modelo infeccioso com levedura, observamos aqui um maior número de bactérias nos animais GILZ^{-/-}, o que pode ser explicado pelas diferenças do agente infeccioso. No modelo de peritonite por *E. coli* a expressão de GILZ em macrófagos parecem ser importantes para o *clearance* uma vez que a deficiência em GILZ leva ao maior número de bactérias na cavidade peritoneal, mesmo em momentos que as contagem celulares são semelhantes nos dois genótipos (6h).

GILZ também foi reportado em aumentar a sobrevivência de animais sépticos associado ao aumento da fagocitose de bactérias por macrófagos superexpressando GILZ e redução de citocinas pró-inflamatórias (Ballegeer, Vandewalle et al. 2019, Ellouze, Vigouroux et al. 2020). Além disso, durante a pneumonia induzida por *Streptococcus pneumoniae* o tratamento com TAT-GILZ diminuiu significativamente a carga bacteriana nas vias aéreas dos camundongos. No mesmo estudo, foram conduzidos ensaios de fagocitose *in vitro* utilizando BMDMs de animais GILZ^{-/-} e WT, e foi mostrado que a fagocitose bacteriana foi prejudicada na ausência do gene GILZ, ao passo que o tratamento com TAT-GILZ aumentou essa função de macrófagos de animais WT (Souza, Carvalho et al. 2022). Esses achados estão em consonância com os do presente estudo, mostramos que a deficiência de GILZ interferiu na fagocitose de *E. coli* em duas linhagens macrofágicas (derivados da medula óssea e peritoneais). Também observamos o efeito do tratamento com TAT-GILZ, em que o pré-tratamento com TAT-GILZ aumentou a função fagocitária dos macrófagos de células WT e resgatou essa função em macrófagos deficientes em GILZ. Em contraste aos dados obtidos nos estudos com os modelos de sepse polimicrobiana, pneumonia pneumocócica e peritonite auto-resolutiva (presente estudo), foi demonstrado que a regulação negativa de GILZ aumenta a fagocitose de *S. typhimurium* por macrófagos (Hoppstädter, Diesel et al. 2019). Embora necessite de estudos adicionais, acreditamos que esse dado contrastante esteja relacionado a cepa da bactéria utilizada. Portanto, no presente estudo, demonstramos que GILZ participa na indução da fagocitose de

E. coli por macrófagos peritoneais e derivados da medula óssea, evidenciando o papel de GILZ nas funções antibacterianas durante infecções.

7 CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem uma nova função pró-resolutiva de GILZ: a indução do recrutamento de macrófagos de maneira não-flogística, dotados de fenótipo anti-inflamatório/regulatório. Mecanicamente, GILZ, por meio do uso da proteína TAT-GILZ, aumenta a liberação de CCL2 que induz o recrutamento de monócitos dependente de CCR2 e a polarização de macrófagos para um fenótipo regulador, associado ao aumento da fosforilação de STAT3, dos marcadores CD206 e Ym1 e da produção de IL-10 e TGF- β . Além disso, no contexto da infecção por *E. coli*, a ausência de GILZ interferiu no recrutamento e fenótipo de macrófagos na fase resolutiva, sendo associado à menores níveis de CCL2, menor apoptose/fagocitose e menor *clearance* bacteriano.

Assim, o presente estudo, em consonância com os dados já descritos do papel de GILZ na apoptose de neutrófilos, eferocitose e fagocitose de bactéria Gram positiva, que mostram a participação de GILZ em etapas chave do processo resolutivo da inflamação, contribui com uma nova descrição funcional de GILZ - o recrutamento não flogístico de macrófagos e sua polarização para fenótipos regulatórios/resolutivos e a atuação na fagocitose de *E. coli* (resumidos no esquema da Figura 13).

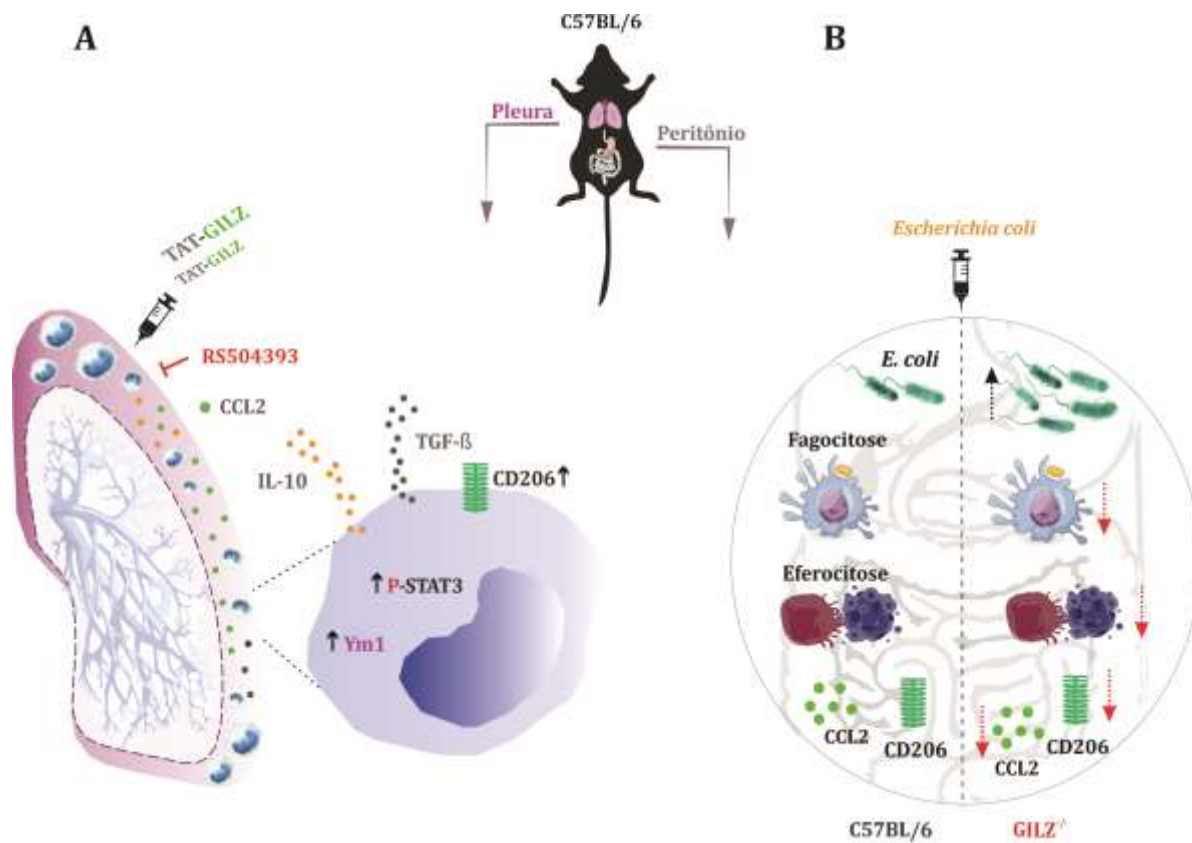


Figura 13 - Desenho esquemático do papel de GILZ no recrutamento de monócitos/macrófagos, reprogramação macrófágica e clearance de *E. coli* no peritônio. A injeção de TAT-GILZ na cavidade pleural de animais C57BL/6 induziu a migração de macrófagos via CCL2, dotados de fenótipo resolutivo/regulador caracterizado pelo aumento da frequência de CD206, expressão de Ym1, liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF-β) associado a maiores níveis de P-STAT3 (A). No contexto da peritonite por *E. coli*, a deficiência de GILZ foi associada a maiores contagens bacterianas, menor fagocitose e eferocitose por macrófagos, assim como menor frequência de CD206 e liberação de CCL2, quando comparados aos animais WT (B).

REFERÊNCIAS

Abdulkhaleq, L., et al. (2018). "The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review." Veterinary world **11**(5): 627.

Alessandri, A. L., et al. (2013). "Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development." Pharmacology & therapeutics **139**(2): 189-212.

Ariel, A. and C. N. Serhan (2012). "New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation." Frontiers in Immunology **3**: 4.

Ayroldi, E., et al. (2001). "Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor κ B." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **98**(3): 743-753.

Ayroldi, E. and C. Riccardi (2009). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action." The FASEB Journal **23**(11): 3649-3658.

Baban, B., et al. (2018). "Glucocorticoid-induced leucine zipper promotes neutrophil and T-cell polarization with protective effects in acute kidney injury." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **367**(3): 483-493.

Ballegeer, M., et al. (2019). "Overexpression of gilz protects mice against lethal septic peritonitis." Shock **52**(2): 208-214.

Barroso, L. C., et al. (2017). "Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice." Frontiers in Immunology **8**: 1596.

Beaulieu, E. and E. F. Morand (2011). "Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis." Nature Reviews Rheumatology **7**(6): 340-348.

Beaulieu, E. and E. F. Morand (2011). "Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis." Nature Reviews Rheumatology **7**(6): 340.

Beaulieu, E., et al. (2010). "Glucocorticoid-induced leucine zipper is an endogenous antiinflammatory mediator in arthritis." Arthritis & Rheumatism **62**(9): 2651-2661.

Berrebi, D., et al. (2003). "Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **101**(2): 729-738.

Bird, L. (2020). "Neurorestorative neutrophils." Nature reviews immunology: 1-1.

Bruscoli, S., et al. (2021). "Glucocorticoid therapy in inflammatory bowel disease: mechanisms and clinical practice." Frontiers in Immunology **12**: 691480.

Bruscoli, S., et al. (2018). "Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits interferon-gamma production in B cells and suppresses colitis in mice." Frontiers in Immunology **9**: 1720.

Bruscoli, S., et al. (2012). "Long glucocorticoid-induced leucine zipper (L-GILZ) protein interacts with ras protein pathway and contributes to spermatogenesis control." Journal of Biological Chemistry **287**(2): 1242-1251.

Buckley, C. D., et al. (2013). "The resolution of inflammation." Nature reviews immunology **13**(1): 59-66.

Byrne, A. and D. J. Reen (2002). "Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils." The Journal of Immunology **168**(4): 1968-1977.

Cannarile, L., et al. (2009). "Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis." Gastroenterology **136**(2): 530-541.

Carmo, A. A., et al. (2014). "Plasmin induces in vivo monocyte recruitment through Protease-Activated Receptor-1-, MEK/ERK-, and CCR2-Mediated Signaling." The Journal of Immunology **193**(7): 3654-3663.

Chiang, N., et al. (2012). "Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements." Nature **484**(7395): 524-528.

Clark, A. R. (2007). "Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes." Molecular and cellular endocrinology **275**(1-2): 79-97.

D'Adamio, F., et al. (1997). "A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death." Immunity **7**(6): 803-812.

Dalli, J. and C. N. Serhan (2017). "Pro-resolving mediators in regulating and conferring macrophage function." Frontiers in Immunology: 1400.

Daly, C. and B. J. Rollins (2003). "Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies." Microcirculation **10**(3-4): 247-257.

Degboé, Y., et al. (2019). "Polarization of rheumatoid macrophages by TNF targeting through an IL-10/STAT3 mechanism." Frontiers in Immunology **10**: 3.

Delfino, D. V., et al. (2004). "Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice." Blood **104**(13): 4134-4141.

Ellouze, M., et al. (2020). "Overexpression of GILZ in macrophages limits systemic inflammation while increasing bacterial clearance in sepsis in mice." European journal of immunology **50**(4): 589-602.

Espinasse, M.-A., et al. (2016). "Glucocorticoid-induced leucine zipper is expressed in human neutrophils and promotes apoptosis through Mcl-1 down-regulation." Journal of innate immunity **8**(1): 81-96.

Fadok, V. A., et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF." The Journal of clinical investigation **101**(4): 890-898.

Feehan, K. T. and D. W. Gilroy (2019). "Is resolution the end of inflammation?" Trends in molecular medicine **25**(3): 198-214.

Galvão, I., et al. (2017). "Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout." European journal of immunology **47**(3): 585-596.

Geissmann, F., et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

Gerlach, B. D., et al. (2021). "Efferocytosis induces macrophage proliferation to help resolve tissue injury." Cell Metabolism **33**(12): 2445-2463. e2448.

Gilroy, D. W., et al. (2004). "Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery." Nature reviews Drug discovery **3**(5): 401-416.

Godson, C., et al. (2000). "Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages." The Journal of Immunology **164**(4): 1663-1667.

Hagiwara, S., et al. (2009). "Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) reduces the levels of inflammatory mediators by inhibiting NF-kB." Inflammation Research **58**(4): 198-203.

Headland, S. E. and L. V. Norling (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. Seminars in immunology, Elsevier.

Hickey, M. J. and P. Kubes (2009). "Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels." Nature reviews immunology **9**(5): 364-375.

Hochreiter-Hufford, A. and K. S. Ravichandran (2013). "Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion." Cold Spring Harbor perspectives in biology **5**(1): a008748.

Hoppstädter, J., et al. (2019). "Amplified host defense by toll-like receptor-mediated downregulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in macrophages." Frontiers in Immunology **9**: 3111.

Hoppstädter, J., et al. (2015). "Glucocorticoid-induced leucine zipper: a critical factor in macrophage endotoxin tolerance." The Journal of Immunology **194**(12): 6057-6067.

Kadmiel, M. and J. A. Cidłowski (2013). "Glucocorticoid receptor signaling in health and disease." Trends in pharmacological sciences **34**(9): 518-530.

Kawakubo, A., et al. (2022). "Origin of M2 M ϕ and its macrophage polarization by TGF- β in a mice intervertebral injury model." International Journal of Immunopathology and Pharmacology **36**: 03946320221103792.

Korns, D., et al. (2011). "Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation." Frontiers in Immunology **2**: 57.

Kumar, H., et al. (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." International reviews of immunology **30**(1): 16-34.

Kurihara, T., et al. (1997). "Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor." Journal of Experimental Medicine **186**(10): 1757-1762.

Kuziel, W. A., et al. (1997). "Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(22): 12053-12058.

Labonte, A. C., et al. (2014). "The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases." Molecules and cells **37**(4): 275.

Lima, K. M., et al. (2017). "The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1." Journal of Biological Chemistry **292**(33): 13758-13773.

Machado, M. G., et al. (2020). "The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia." The FASEB Journal **34**(2): 2749-2764.

Maciuszek, M., et al. (2019). "Effects of stress and cortisol on the polarization of carp macrophages." Fish & Shellfish Immunology **94**: 27-37.

Magalhaes, G. S., et al. (2018). "angiotensin-(1–7) Promotes resolution of eosinophilic inflammation in an experimental Model of asthma." Frontiers in Immunology **9**: 58.

Mattos, M. S., et al. (2020). "Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation." Journal of leukocyte biology.

McArthur, S., et al. (2015). "Definition of a novel pathway centered on lysophosphatidic acid to recruit monocytes during the resolution phase of tissue inflammation." The Journal of Immunology **195**(3): 1139-1151.

Medzhitov, R. (2010). "Inflammation 2010: new adventures of an old flame." Cell **140**(6): 771-776.

Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." Journal of leukocyte biology **73**(2): 209-212.

Mu, X., et al. (2018). "Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer." Cell Cycle **17**(4): 428-438.

Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nature reviews immunology **11**(11): 723-737.

Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." Nature **420**(6917): 846-852.

Nathan, C. and A. Ding (2010). "Nonresolving inflammation." Cell **140**(6): 871-882.

Negreiros-Lima, G. L., et al. (2020). "Cyclic AMP Regulates Key Features of Macrophages via PKA: Recruitment, Reprogramming and Efferocytosis." Cells **9**(1): 128.

Ngo, D., et al. (2013). "Divergent effects of endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models of inflammation and arthritis." Arthritis & Rheumatism **65**(5): 1203-1212.

Norling, L. and C. Serhan (2010). "Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination." Journal of internal medicine **268**(1): 15-24.

Nourshargh, S. and F. M. Marelli-Berg (2005). "Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function." Trends in immunology **26**(3): 157-165.

Oakley, R. H. and J. A. Cidlowski (2011). "Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids." Journal of Biological Chemistry **286**(5): 3177-3184.

Oishi, Y. and I. Manabe (2018). "Macrophages in inflammation, repair and regeneration." International immunology **30**(11): 511-528.

Perretti, M., et al. (2015). "Resolution pharmacology: opportunities for therapeutic innovation in inflammation." Trends in pharmacological sciences **36**(11): 737-755.

Perucci, L. O., et al. (2017). "Annexin A1 and specialized proresolving lipid mediators: promoting resolution as a therapeutic strategy in human inflammatory diseases." Expert opinion on therapeutic targets **21**(9): 879-896.

Petri, B., et al. (2008). "The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective." The Journal of Immunology **180**(10): 6439-6446.

Poon, I. K., et al. (2014). "Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential." Nature reviews immunology **14**(3): 166-180.

Prince, L. R., et al. (2011). "The role of TLRs in neutrophil activation." Current opinion in pharmacology **11**(4): 397-403.

Proto, J. D., et al. (2018). "Regulatory T cells promote macrophage efferocytosis during inflammation resolution." Immunity **49**(4): 666-677. e666.

Raes, G., et al. (2005). "Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells." The Journal of Immunology **174**(11): 6561-6562.

Rasheed, A. and K. J. Rayner (2021). "Macrophage responses to environmental stimuli during homeostasis and disease." Endocrine Reviews **42**(4): 407-435.

Riccardi, C., et al. (2018). Immunopharmacology and Inflammation, Springer.

Ricci, E., et al. (2019). "GILZ restrains neutrophil activation by inhibiting the MAPK pathway." Journal of leukocyte biology **105**(1): 187-194.

Romero, Y., et al. (2012). "The glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) is essential for spermatogonial survival and spermatogenesis." Sexual Development **6**(4): 169-177.

Ronchetti, S., et al. (2015). "GILZ as a mediator of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids." Frontiers in endocrinology **6**: 170.

Schif-Zuck, S., et al. (2011). "Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b^{low} macrophages: Modulation by resolvins and glucocorticoids." European journal of immunology **41**(2): 366-379.

Serbina, N. V. and E. G. Pamer (2006). "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2." Nature immunology **7**(3): 311-317.

Serhan, C. N. (2007). "Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways." Annu. Rev. Immunol. **25**: 101-137.

Serhan, C. N., et al. (2008). "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." Nature reviews immunology **8**(5): 349-361.

Serhan, C. N. and J. Savill (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." Nature immunology **6**(12): 1191-1197.

Shiraishi, D., et al. (2012). "Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation." Biochemical and biophysical research communications **425**(2): 304-308.

Simon, S. I. and C. E. Green (2005). "Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation." Annu. Rev. Biomed. Eng. **7**: 151-185.

Sousa, L. P., et al. (2013). "Pharmacological strategies to resolve acute inflammation." Current opinion in pharmacology **13**(4): 625-631.

Souza, J. A. M., et al. (2022). "Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Alleviates Lung Inflammation and Enhances Bacterial Clearance during Pneumococcal Pneumonia." Cells **11**(3): 532.

Sugimoto, M. A., et al. (2017). "Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1." Blood **129**(21): 2896-2907.

Sugimoto, M. A., et al. (2016). "Resolution of inflammation: what controls its onset?" Frontiers in Immunology **7**: 160.

Sugimoto, M. A., et al. (2019). "Mediators of the resolution of the inflammatory response." Trends in immunology **40**(3): 212-227.

Sugimoto, M. A., et al. (2016). "Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance." Journal of immunology research **2016**.

Tavares, L. P., et al. (2022). Pro-resolving therapies as potential adjunct treatment for infectious diseases: Evidence from studies with annexin A1 and angiotensin-(1-7). Seminars in Immunology, Elsevier.

Tavares, L. P., et al. (2020). "Granulocyte-targeted therapies for airway diseases." Pharmacological research **157**: 104881.

Vago, J. P., et al. (2020). "Glucocorticoid-induced leucine zipper modulates macrophage polarization and apoptotic cell clearance." Pharmacological research: 104842.

Vago, J. P., et al. (2012). "Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis." Journal of leukocyte biology **92**(2): 249-258.

Vago, J. P., et al. (2019). "Plasminogen and the plasminogen receptor, Plg-RKT, regulate macrophage phenotypic, and functional changes." Frontiers in Immunology **10**: 1458.

Vago, J. P., et al. (2015). "The role and effects of glucocorticoid-induced leucine zipper in the context of inflammation resolution." The Journal of Immunology **194**(10): 4940-4950.

Vago, J. P., et al. (2020). "Exploiting the pro-resolving actions of glucocorticoid-induced proteins Annexin A1 and GILZ in infectious diseases." Biomedicine & Pharmacotherapy **133**: 111033.

Vago, J. P., et al. (2016). "Proresolving actions of synthetic and natural protease inhibitors are mediated by annexin A1." The Journal of Immunology **196**(4): 1922-1932.

Vandevyver, S., et al. (2013). "New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation." Endocrinology **154**(3): 993-1007.

Wang, N., et al. (2014). "Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance." Frontiers in Immunology **5**: 614.

Wright, T. K., et al. (2016). "Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease." Respirology **21**(3): 467-475.

Yao, R.-R., et al. (2018). "M2-polarized tumor-associated macrophages facilitated migration and epithelial-mesenchymal transition of HCC cells via the TLR4/STAT3 signaling pathway." World journal of surgical oncology **16**(1): 1-9.

Yuan, S. Y., et al. (2012). "Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function." Microvascular research **83**(1): 82-88.

Zaidan, I., et al. (2022). "Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis." JCI insight **7**(1).

ANEXO I

**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 183/2017**Título do projeto:** Estudo do papel de proteínas induzidas por glicocorticoides no contexto da inflamação**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Lirlândia Pires de Sousa**Unidade:** Faculdade de Farmacia**Departamento:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**Situação atual:** Decisão Final - Aprovado

Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 26/02/2018. Validade: 26/02/2018 à 25/02/2023 Prezado pesquisador, este protocolo foi aprovado, contudo deve-se ressaltar para o pesquisador que foram aprovados os animais de acordo com o cálculo apresentado, ou seja, n=6, para os experimentos in vivo, não sendo permitida a realização de triplicatas. Assim, o número total de animais aprovados é 178.

Belo Horizonte, 26/02/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II

Produções científicas durante o período do mestrado

1) Zaidan I, Tavares LP, Sugimoto MA, Lima KM, Negreiros-Lima GL, Teixeira LC, Miranda TC, Valiate BV, Cramer A, Vago JP, Campolina-Silva GH, Souza JA, **Grossi LC**, Pinho V, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, Teixeira MM, Galvão I, Sousa LP. Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis. *JCI Insight*. 2022 Jan 11;7(1):e147819.

2) Souza, J.A.M.; Carvalho, A.F.S.; **Grossi, L.C.**; Zaidan, I.; de Oliveira, L.C.; Vago, J.P.; Cardoso, C.; Machado, M.G.; Souza, G.V.S.; Queiroz-Junior, C.M.; Morand, E.F.; Bruscoli, S.; Riccardi, C.; Teixeira, M.M.; Tavares, L.P.; Sousa, L.P. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Alleviates Lung Inflammation and Enhances Bacterial Clearance during Pneumococcal Pneumonia. *Cells* 2022, 11, 532.

3) Sanches RCO, Tiwari S, **Ferreira LCG**, Oliveira FM, Lopes MD, Passos MJF, Maia EHB, Taranto AG, Kato R, Azevedo VAC and Lopes DO (2021) Immunoinformatics Design of Multi-Epitope Peptide-Based Vaccine Against *Schistosoma mansoni* Using Transmembrane Proteins as a Target. *Front. Immunol.* 12:621706.

4) Paper submetido “Plasmin and plasminogen prevent sepsis severity by reducing neutrophil extracellular traps and systemic inflammation.” Juliana P. Vago, Isabella Zaidan, Luiza O. Perucci, Larissa F. Brito, Livia C. R. Teixeira, Camila M. Silva, Thaís C. Miranda, Eliza M. Melo, Alexandre S. Bruno, Celso Queiroz-Junior, Michelle A. Sugimoto, Luciana P. Tavares, **Laís C. Grossi**, Isabela N. Borges, Nagyung Baik, André Talvani, Raphael G. Ferreira, José C. Alves-Filho, Vandack Nobre, Mauro M. Teixeira, Robert J. Parmer, Lindsey A. Miles and Lirlândia P. Sousa. (our reference 166044-INS-RG-1).

5) Paper submetido “Ouratein D, the anti-gout biflavanone of *Ouratea spectabilis*, reduces the activation of the inflammasome pathway”. Marina P. Rocha; Diego P. Oliveira; Vivian Louise Soares de Oliveira; Isabella Zaidan; **Laís C. Grossi**; Priscilla R. V. Campana; Flávio A. Amaral; Lirlândia P. Sousac; Mauro M. Teixeira; Fernão C. Braga*